



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTA' DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN "FRUTTICOLTURA MEDITERRANEA" XXIV CICLO

Applicazione della coltura *in vitro* alla propagazione di portinnesti di agrumi tolleranti al virus della tristezza e del gelso



Tutor

Ch. ma Prof.ssa Maria Antonietta Germanà

Coordinatore del dottorato

Ch. ma Prof.ssa Maria Antonietta Germanà

Dottorando

Dott. Fabrizio Giuseppe Casales

Anno Accademico

2012-2013

Indice

PRIMA PARTE	1
1. LA COLTURA <i>IN VITRO</i>	1
1.1 Breve storia della coltura <i>in vitro</i> dei vegetali	1
1.2 La micropropagazione	2
1.2.1 Stadi della micropropagazione.....	3
1.3 Applicazioni della coltura <i>in vitro</i>	12
1.3.1 Coltura in vitro per il risanamento da patogeni	12
1.3.2 Conservazione del germoplasma.....	13
1.3.3 Coltura in vitro per il miglioramento genetico	14
2. LA BIOTIZZAZIONE	18
2.1 I funghi micorrizici arbuscolari (AMF)	18
2.2 I Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB).....	22
3. GLI AGRUMI.....	24
3.1 Origine	24
3.2 Classificazione	24
3.3 Cenni botanici	25
3.4 Esigenze pedoclimatiche.....	26
3.5 Proprietà nutritive degli agrumi	27
3.6 Diffusione ed importanza economica degli agrumi.....	27
3.7 Caratteristiche dei principali portinnesti adoperati in agrumicoltura	29
3.8 La propagazione degli agrumi	34
3.9 Innovazioni tecnologiche e sviluppo del vivaismo agrumicolo.....	36
3.10 Evoluzione e prospettive dei portinnesti adoperati in agrumicoltura	38
4. IL GELSO	40
4.1 Inquadramento tassonomico e botanica	40
4.2 Stato dell'arte della micropropagazione del gelso.....	41
SECONDA PARTE	42

1. INTRODUZIONE	42
2. RADICAZIONE ED INCAPSULAMENTO DI TALEE VITRO- DERIVATE DI CITRANGE [<i>Citrus sinensis</i> (L.) OSB. X <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) RAF] CARRIZO.....	44
2.1 Introduzione.....	44
2.2 Materiali e metodi.....	44
2.3 Risultati e discussioni	46
2.4 Conclusioni.....	47
Tabelle	48
Figure	49
3. RISULTATI PRELIMINARI SULLA BIOTIZZAZIONE DI PROPAGULI INCAPSULATI VITRO-DERIVATI DI CITRANGE [<i>Citrus</i> <i>sinensis</i> (L.) OSB. X <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) RAF.] CARRIZO	50
3.1 Introduzione.....	50
3.2 Materiali e metodi.....	51
3.3 Risultati e discussioni	53
3.4 Conclusioni.....	55
Tabelle	56
Figure	58
4. MICORRIZZAZIONE EX-VITRO DI PIANTINE VITRO-DERIVATE DI CITRANGE [<i>Citrus sinensis</i> (L.) OSB. × <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) RAF.] CARRIZO	59
4.1 Introduzione.....	59
4.2 Materiali e metodi.....	60
4.3 Risultati	62
4.4 Conclusioni.....	63
Tabella.....	64
Figure	65
5. STUDIO SULLA CONVERSIONE DI PROPAGULI INCAPSULATI VITRO-DERIVATI DI CITRANGE[<i>Citrus sinensis</i> (L.) OSB. × <i>Poncirus</i> <i>trifoliata</i> (L.) RAF.] C35	66
5.1 Introduzione.....	66

5.2	Materiali e metodi.....	67
5.3	Risultati e discussione.....	68
5.4	Conclusioni.....	68
	Tabelle	70
	Figure	71
6.	STUDIO SULL'INCAPSULAMENTO DI MICROTALIEE <i>VITRO</i>- DERIVATE DI UN GENOTIPO SICILIANO DI GELSO (<i>Morus nigra</i> L.).....	72
6.1	Introduzione.....	72
6.2	Materiali e metodi.....	73
6.3	Risultati e discussioni	73
6.4	Conclusioni.....	74
	Tabelle	75
	Figure	76
7.	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE IN MERITO AL PROGETTO DI RICERCA SVOLTO	77
8.	BIBLIOGRAFIA	78
9.	ABBREVIAZIONI	97
10.	ELENCO DELLE PRODUZIONI EFFETTUATE DURANTE IL DOTTORATO DI RICERCA	99
11.	RINGRAZIAMENTI	106

PRIMA PARTE

1. La coltura *in vitro*

1.1 Breve storia della coltura *in vitro* dei vegetali

La coltura *in vitro* si basa sul fenomeno della totipotenza delle cellule vegetali, ovvero la capacità che ha una singola cellula o gruppi di cellule di rigenerare un'intera pianta. Tale concetto fu introdotto nel 1838 da due biologi tedeschi, M. J. Schleiden e T. Schwann. Nel 1902 G. Haberlandt effettuò la coltura *in vitro* di porzioni di mesofillo fogliare e di cellule del capillizio radicale sebbene il risultato fu infruttuoso, in quanto, a quell'epoca, non erano stati ancora scoperti i regolatori di crescita. Le teorie di Haberlandt non passarono inosservate nel mondo scientifico ed i suoi studi furono continuati da Hanning (1904), che allevò *in vitro* embrioni quasi maturi prelevati da semi di numerose crucifere. Il tedesco Kotte e lo statunitense Robbins (USA), indipendentemente, misero a punto un protocollo per la moltiplicazione di meristemi radicali in un mezzo di coltura a composizione minerale, ma non ne ottennero la crescita illimitata. Nel 1934 White dimostrò la crescita *in vitro* di apici radicali di pomodoro e la possibilità di questi di essere subcolturali in un mezzo composto da sali inorganici con l'aggiunta di estratto di lievito, ottima fonte di vitamina B. Nel 1937, i fisiologi vegetali F. Went e K. Thimann scoprirono il primo ormone vegetale, l'acido indol-acetico (IAA). Con la scoperta delle auxine, a partire dagli anni '30, si ebbero rapidi progressi nel campo della coltura di tessuti vegetali. Nel 1939 l'americano White ed i francesi Gautheret e Nobécourt, indipendentemente, dimostrarono che per ottenere una crescita illimitata *in vitro* di tessuti non meristemati era necessaria la presenza di una auxina (IAA) negli espianti (White) o nel mezzo di coltura (Gautheret e Nobécourt). Nel 1955 il francese Morel ottenne piante di Dalia e di Orchidea esenti da virus attraverso coltura *in vitro* di meristemi; inoltre, misero a punto il protocollo per la propagazione massiva di *Orchidacee* da protocormi rigenerati *in vitro*. Contemporaneamente negli USA il botanico svedese Folke K. Skoog, isolò la prima citochinina (kinetina o 6-benzil-amminopurina) e dimostrò la sua funzione sulla promozione della divisione cellulare in colture di calli di tabacco. Nel 1957, Skoog e Miller dimostrarono che rapporti ben precisi tra auxine e citochinine provocano il differenziamento *in vitro* di radici e germogli da colture di tessuti fogliari di tabacco. Nello stesso anno, si venne a conoscenza di una terza classe di regolatori di crescita, le gibberelline. La scoperta di quest'ultime si diffuse presto e se ne studiarono dapprima gli effetti *in vivo*, mentre le ricerche *in vitro* iniziarono lentamente alla fine degli anni '50 e proseguirono con maggiore rapidità negli anni '60 e '70. Nel 1960, Jones ottenne la prima linea

clonale dimostrando la produzioni di cloni da singola cellula. Cocking, in quell'anno, riuscì ad ottenere per la prima volta cellule vitali vegetali prive di parete (protoplasti). Lo studio della totipotenza dei protoplasti consentì l'ibridazione somatica di specie sessualmente incompatibili e numerosi programmi di miglioramento genetico furono pertanto messi a punto sfruttando quest'ultima tecnica per l'ottenimento di nuove cultivar. Nel 1962, Skoog insieme allo scienziato T. Murashige durante la ricerca per un regolatore di crescita, mise a punto il terreno di Murashige e Skoog, che è ancora oggi il mezzo più usato nel campo delle colture *in vitro* di cellule vegetali. Un altro passo in avanti nel campo della coltura di tessuti vegetali è stato fatto nel 1966 quando Guha e Maheshwari (USA) dimostrarono la possibilità di ottenere piante aploidi o di-aploidi da colture *in vitro* di antere di *Datura innoxia*. Tale scoperta fu accolta con notevole interesse, in quanto le piante ottenute da cellule aploidi sottoposte a raddoppiamento dei cromosomi sono omozigoti e manifestano tutti i geni recessivi dando origine a delle linee pure. Più tardi, i lavori di Bourgin e Nitsch (1967) confermarono la possibilità di ottenere piante aploidi da antere di tabacco. Il settore della coltura in vitro ebbe una svolta radicale agli inizi degli anni '70 con la scoperta delle endonucleasi di restrizione. Tali enzimi consentono di tagliare le molecole di DNA in punti prestabiliti, permettendo la rimozione di geni e la loro successiva modificazione ed inserzione in altre porzioni di DNA. Negli anni '80 si cominciò a lavorare sulla trasformazione genetica delle piante su cui investirono numerose società, in particolare statunitensi. L'affermarsi delle piante geneticamente modificate è stato particolarmente rapido ed ha provocato un vero e proprio rinnovamento in agricoltura.

1.2 La micropropagazione

Tra le esigenze della moderna agricoltura riveste particolare importanza la disponibilità di varietà caratterizzate da 4 requisiti fondamentali: uniformità, stabilità, distinguibilità ed elevato valore agronomico. In particolar modo per le specie arboree, indipendentemente dal sistema propagativo, l'unico sistema che consente di ottenere una perfetta omogeneità genetica è la produzione di cloni attraverso la propagazione vegetativa, tradizionalmente talee, margotta, propaggine ed innesto. Un sistema ormai consolidato per l'ottenimento di cloni nel campo vivaistico è la micropropagazione. Per micropropagazione s'intende una tecnica di propagazione *in vitro* che consiste nella moltiplicazione vegetativa di piante attraverso la coltura di loro parti, dette espianti (organi, tessuti o cellule), in condizioni di sterilità, ricorrendo a substrati nutritivi di composizione nota ed usufruendo di condizioni ambientali controllate dal punto di vista termico e luminoso. Il principale vantaggio della micropropagazione risiede nella possibilità di ottenere elevate quantità di piantine complete di apparato caulinare e radicale, uniformi nello

sviluppo ed omogenee come costituzione genetica, anche disponendo di materiale iniziale molto limitato. Nei confronti delle tecniche tradizionali di propagazione vegetativa, la micropropagazione presenta i seguenti vantaggi:

- Ridotto materiale richiesto per avviare la coltura *in vitro*
- Elevato tasso di moltiplicazione
- Con opportune precauzioni, uniformità genetica
- Propagazione di piante difficilmente propagabili con i metodi tradizionali
- Ridotto spazio richiesto
- Sanità dei materiali ottenuti, partendo da materiale sano
- Propagazione maggiormente indipendente dall'andamento stagionale
- Eventuale possibilità di risanamento da virosi
- Possibilità di moltiplicare i prodotti del miglioramento genetico
- Conservazione del germoplasma

Tuttavia, la micropropagazione presenta anche degli svantaggi, ovvero:

- Costi elevati per l'acquisto delle attrezzature
- Necessita di personale specializzato
- Eventualità del verificarsi della variabilità somaclonale
- Rischi di contaminazione
- Impossibilità di micropropagare alcune specie poiché recalcitranti alla coltura *in vitro*

1.2.1 Stadi della micropropagazione

Nella micropropagazione, è possibile individuare cinque stadi fondamentali (da 0 a IV). Questi stadi, oltre a descrivere le procedure applicate nel processo della micropropagazione, rappresentano anche dei punti in corrispondenza dei quali vengono modificate le condizioni ambientali della coltura (Miller e Murashige, 1976).

Stadio 0: selezione e preparazione della pianta madre

La qualità dell'espianto e la successiva risposta *in vitro* sono significativamente influenzate dalle condizioni fitosanitarie e fisiologiche della pianta madre (Debergh e Maene, 1981; Read, 1988). Prima dell'impianto della coltura, particolare attenzione deve essere riposta nella selezione e nel mantenimento delle piante madri utilizzate come fonti d'espanti. L'utilizzo di appropriate

pratiche agronomiche permette il prelievo di espianti di maggiori dimensioni ed una più rapida risposta in vitro senza incorrere in maggiori rischi di contaminazione.

Stadio I: impianto della coltura asettica

L'obiettivo di questo stadio è iniziare e stabilizzare una coltura di meristemi terminali o laterali priva di patogeni. Gli espianti primari prelevati delle piante madri sono sottoposti a sterilizzazione della superficie esterna. La presenza di contaminazioni microbiche influisce negativamente sulla sopravvivenza dei germogli, sulla loro crescita e sulla successiva proliferazione. I seguenti fattori possono avere influenza sul buon esito dello stadio I:

- 1) epoca di prelievo dell'espianto;
- 2) posizione dell'espianto sulla pianta;
- 3) dimensione dell'espianto;
- 4) ossidazione per opera di polifenoli.

Ovviamente non esiste un mezzo universale per l'impianto della coltura asettica di qualunque specie. Tuttavia, i mezzi maggiormente usati rappresentano modificazioni della formulazione di base del mezzo di Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962). Le citochinine e le auxine sono aggiunte frequentemente ai mezzi di coltura utilizzati nello Stadio I per favorire la sopravvivenza degli espianti e lo sviluppo dei germogli (Hu e Wang, 1983). I tipi e le concentrazioni di fitoregolatori utilizzati nello stadio I dipenderanno dalla specie, dal genotipo e dalle dimensioni dell'espianto. La 6-benziladenina (BA), per il suo basso costo e la sua elevata efficienza, è la citochinina maggiormente usata (Gaspar *et al.*, 1996). Come auxine sono maggiormente utilizzati due composti: l'acido α -naftalenacetico (NAA), una auxina sintetica, e l'acido 3-indolbutirrico (IBA), una auxina naturale. Per i mezzi di coltura utilizzati nello stadio I sono scelte combinazioni e concentrazioni di fitoregolatori in grado di promuovere l'impianto e lo sviluppo della coltura, ma allo stesso tempo limitare la formazione di callo e gemme avventizie.

Stadio II: proliferazione di germogli ascellari

Lo stadio II è caratterizzato da ripetuti cicli di proliferazione di germogli ascellari da germogli apicali o laterali, allevati in un mezzo di coltura contenenti livelli di citochinina più elevati per inattivare la dominanza apicale della gemma terminale. Nello stadio II le colture sono regolarmente suddivise in gruppi di germogli minori dimensioni, singoli germogli apicali o segmenti nodali, i quali sono utilizzati come propaguli per ulteriore proliferazione. Il numero di possibili subcolture effettuabili in questa fase, dipende dalla specie o dalla cultivar e dalla sua capacità di mantenere un tasso di proliferazione accettabile e, allo stesso tempo, un livello

minimo di variabilità genetica (Kurtz *et al.*, 1991). Alcune specie possono essere mantenute allo stadio II con subcolture mensili per una durata da 8 a 48 mesi. Nello stadio II, la scelta del tipo di citochinina e della sua concentrazione si basa sul tasso di moltiplicazione, la lunghezza dei germogli e la frequenza di variazioni genetiche.

Stadio III: pre-trapianto (radicazione)

Questo stadio consiste nel preparare i germogli o i gruppi di germogli ottenuti nello stadio II alla fase di trasferimento nel suolo. Il processo può includere: 1) allungamento dei germogli prima della radicazione; 2) radicazione di germogli singoli o di gruppi di germogli; 3) soddisfacimento mediante trattamento a freddo della dormienza degli organi di riserva; 4) “preindurimento” delle colture per aumentare la sopravvivenza. Vi sono molte ragioni a favore dell’eliminazione di questo stadio. Il costo dello stadio III viene stimato dal 35 al 75% del costo totale di produzione. L’eliminazione dello stadio III comporta pertanto un considerevole risparmio. Inoltre, l’apparato radicale formatosi *in vitro* risulta spesso in buona parte non funzionale e destinato a morire dopo il trapianto. Ciò implica un ritardo di crescita delle plantule prima che si formino nuove radici avventizie. Tuttavia, per varie ragioni, il trapianto diretto delle microtalee nel suolo non è sempre realizzabile. Debergh e Maene (1981) proposero che la funzione di tale stadio fosse semplicemente di allungare i gruppi di germogli ottenuti nello stadio II prima della loro separazione e radicazione *ex vitro*. I germogli dotati di maggiore lunghezza possono inoltre subire un pretrattamento in una soluzione di auxine prima del trapianto.

Stadio IV: trasferimento all’ambiente esterno

Il buon esito della coltura di germogli o di segmenti nodali dipende dall’abilità di trasferire le plantule dai contenitori alle serre di climatizzazione e nel ristabilire una loro crescita attiva. Ciò implica acclimatare o preparare le plantule a condizioni di umidità relativa significativamente inferiori e di intensità luminosa superiori. Tuttavia, anche quando la procedura d’acclimatazione è applicata con attenzione, non è infrequente riscontrare un basso indice di sopravvivenza delle plantule. Le difficoltà che le piante micropropagate pongono al momento del trapianto sono principalmente da ascrivere a due cause: 1) il sistema eterotrofo di nutrizione e 2) il basso livello di autoregolazione idrica. Le piante allevate *in vitro* in presenza di saccarosio, in condizioni di bassa luminosità e di ridotti scambi gassosi, manifestano una limitata o quasi assente capacità foto sintetica. Durante l’acclimatazione le piante hanno la necessità di passare rapidamente da uno stato eterotrofo ad uno autotrofo (Preece e Sutter, 1991). Sfortunatamente questo passaggio non è immediato. Per superare queste limitazioni, le piante sono trapiantate in un substrato sterile e ben drenato e mantenute in condizioni di umidità relativa elevata, ridotta intensità luminosa ed una temperatura compresa tra i 20 ed i 27°C. L’U.R. può essere sempre controllata mediante

coperture con materiale plastico. Le piante vengono acclimatate riducendo gradualmente l'U.R. in un periodo di tempo compreso tra 1 e 4 settimane. Esse, inoltre, sono gradualmente sottoposte a condizioni di maggiore intensità luminosa per favorire una rapida crescita.

I metodi per propagare *in vitro* le piante variano, a seconda della specie e delle condizioni di coltura, e sono riassumibili in 5 modalità:

1. Propagazione per germogli ascellari
2. Coltura di segmenti nodali
3. Organogenesi
4. Embriogenesi somatica
5. Seme sintetico

Propagazione per germogli ascellari

E' il sistema di clonazione *in vitro* maggiormente utilizzato nell'attività vivaistica. La propagazione per germogli ascellari rappresenta un metodo affidabile di propagazione per un gran numero di specie (Kurtz *et al.*, 1991), e si basa sullo stimolo dello sviluppo delle gemme ascellari a seguito dell'annullamento della dominanza apicale provocata nella gemma apicale aggiungendo al mezzo di coltura fitoregolatori di crescita, quali le citochinine (George, 1993). I germogli che si ottengono vengono in seguito sezionati in gemme apicali e segmenti nodali che possono essere a loro volta utilizzati come espianti secondari per dare origine ad ulteriore proliferazione di germogli, oppure usarli direttamente come microtalee da sottoporre a radicazione. I vantaggi della propagazione per germogli ascellari rispetto alla coltura di meristemi sono: una maggiore sopravvivenza, una più rapida risposta in coltura e la disponibilità di un maggior numero di gemme ascellari. Di contro, poiché gli espianti sono di maggiori dimensioni, si hanno maggiori difficoltà nella sterilizzazione ed essi possono potenzialmente ospitare infezioni microbiche a livello sistemico.

Una volta stabilizzata, la coltura di germogli ascellari consente dei tassi di moltiplicazione affidabili e duraturi, una minore suscettibilità a variazioni genetiche e viene anche adoperata per la propagazione clonale di chimere.

Coltura di segmenti nodali

Considerata una semplificazione della coltura di germogli è un altro metodo di propagazione di meristemi preformati. Tale tecnica viene applicata a specie come la patata, il *Lilium* che non rispondono bene allo stimolo fornito dalle citochinine e pertanto non danno una proliferazione di

germogli ascellari paragonabile a quella di altre specie normalmente micropropagate. In questo caso lo sviluppo delle gemme ascellari ha origine sia dalla coltura di germogli integri posizionati orizzontalmente sul mezzo (propaggine *in vitro*), sia dalla coltura di segmenti nodali singoli o multipli. Gli espianti daranno origine, con una certa rapidità, a singoli germogli allungati privi di ramificazioni e costituiti da più nodi. Tali germogli (microtalee) potranno essere utilizzati per la radicazione *in vitro*, per l'acclimatamento *ex vitro*, oppure suddivisi ulteriormente in nuovi segmenti nodali per iniziare nuove colture.

Organogenesi

L'organogenesi è un processo che può considerarsi unico delle piante e consiste nella produzione di strutture unipolari (radici o germogli) a partire da aggregati cellulari o tessuti vegetali non meristemati, attraverso la formazione di centri meristemati avventizi, detti meristemoidi. Questi ultimi si presentano come aggregati di cellule simili a quelle meristematiche (cioè cellule di minori dimensioni, isodiametriche, con pareti cellulari sottili, fornite di vacuoli piccoli e con nucleo e citoplasma densamente colorati se sottoposti a fissazione) (Thorpe, 1978; 1982). L'organogenesi può avvenire per via diretta od indiretta, a seconda che i meristemoidi si sviluppino direttamente a partire da un espianto di tessuto iniziale oppure implicino la produzione intermedia di un callo, cioè di un aggregato cellulare indifferenziato. Il processo organogenetico è in relazione con la specie e il genotipo usato, ed è controllato dalla composizione del terreno di coltura e da fattori fisici ed ambientali. Nel 1957, Skoog e Miller dimostrarono l'importanza fondamentale dei regolatori di crescita ed, in particolare, del rapporto tra auxine e citochinine per il ruolo che questi ormoni svolgono nel controllo del processo organogenetico. In particolare, essi evidenziarono come mezzi di coltura con rapporti auxine/citochinine elevati inducono la formazione di radici (rizogenesi), mentre quelli con rapporti auxine/citochinine bassi inducono la formazione di germogli (caulogenesi). Quando auxine e citochinine si equivalgono nel mezzo di coltura viene promossa la formazione di callo (callogenesi). L'ottenimento di una pianta completa, ovvero dotata sia dell'apparato aereo che di quello radicale, da un qualsiasi espianto attraverso organogenesi prevede due fasi distinte della coltura *in vitro*: generalmente viene prima promossa la differenziazione dei germogli che verranno successivamente trattati affinché possano generare le radici. E' comunque possibile la sequenza inversa, cioè rizogenesi seguita da caulogenesi. Sebbene il processo di organogenesi sia regolato dal rapporto auxine/citochinine, altri fattori possono influenzare il processo di differenziazione *in vitro*, come ad esempio la concentrazione di sali minerali, vitamine e

carboidrati, il pH del substrato di coltura, la disponibilità di luce, la temperatura e l'umidità relativa.

Embriogenesi somatica

L'embriogenesi somatica è stata considerata come una delle più importanti conquiste nel settore delle colture *in vitro* di tessuti cellulari. Tale modello rigenerativo si basa sulla formazione di strutture morfologicamente e fisiologicamente simili a quelle degli embrioni zigotici da parte di singole cellule di qualsiasi organo vegetale. L'embriogenesi somatica porta dunque alla formazione di individui completi per mezzo di embrioni somatici. Questi presentano una struttura bipolare, con un meristema apicale ed uno radicale in grado di svilupparsi in una pianta completa di radici, fusto, foglie e fiori attraverso stadi ontogenetici del tutto simili a quelli che caratterizzano la germinazione e lo sviluppo degli embrioni zigotici. L'embriogenesi somatica, come l'organogenesi, prevede una fase di induzione seguita da una fase di differenziazione, con la differenza fondamentale però dell'acquisizione immediata di bipolarità da parte della cellula precursore. Come l'organogenesi, anche l'embriogenesi somatica *in vitro* può avvenire per via diretta, a partire da cellule somatiche dell'espianto iniziale, oppure per via indiretta, a partire da cellule indifferenziate del callo intermedio. L'embriogenesi somatica è potenzialmente il metodo di clonazione *in vitro* più rapido ed efficiente. Rispetto ad altre tecniche di micropropagazione presenta però alcuni svantaggi che ne limitano l'applicabilità, ovvero il fenomeno dell'asincronia e dell'instabilità genetica. L'asincronia è legata alla difficoltà di rendere uniforme e contemporaneo il processo di sviluppo di tutti gli embrioni, mentre l'insorgenza di mutazioni genetiche si osserva prevalentemente durante l'embriogenesi indiretta ed è accentuata dalla presenza nel mezzo di coltura di sostanze ad azione mutagena, come ad esempio il 2,4-D. La possibilità di rigenerare piante complete attraverso l'embriogenesi ha rappresentato un passaggio fondamentale non solo per la propagazione *in vitro*, ma anche per lo sviluppo delle biotecnologie genetiche cellulari. Particolarmente significative sono state le applicazioni volte all'ottenimento di ibridi somatici, piante aploidi, mutanti somaclonali, piante transgeniche e semi sintetici.

Seme sintetico

Il concetto di seme sintetico risale al 1977, quando in occasione del *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes*, tenuto a Gent (Belgio), il ricercatore americano T. Murashige suggerì la possibilità di usare l'embriogenesi somatica per ottenere propaguli vegetativi bipolari (embrioni somatici o embrioidi), funzionalmente simili agli embrioni zigotici. Inoltre, nel 1978 egli introdusse il concetto di seme sintetico definendolo "un singolo embrione

somatico incapsulato”. Questa definizione limita la produzione dei semi sintetici al solo uso degli embrioni somatici che sono propaguli bipolari rigenerati attraverso l’embriogenesi somatica, i quali possono essere contenuti dentro una matrice che dovrebbe permettere la loro manipolazione e semina. Su questo argomento Kozai *et al.*, (1991) hanno riportato elevati rischi di variazione somaclonale associati all’embriogenesi somatica, specialmente in alcune specie, e questo ha rappresentato pertanto un grave problema, dal momento che invalida il concetto cardine che sta dietro alla tecnologia del seme sintetico e l’uso dell’embriogenesi somatica come metodo di moltiplicazione clonale. Allo stesso tempo, Bapat *et al.*, (1987), hanno proposto la produzione di semi sintetici anche attraverso l’incapsulamento di altri propaguli *vitro*-derivati diversi rispetto agli embrioni somatici. Da quel momento, aumentò il numero di studi in merito all’uso di propaguli non embriogenici per la produzione dei semi sintetici, e la loro definizione si modificò come “embrioni somatici artificialmente incapsulati, gemme, germogli o qualsiasi altro tessuto meristematico usato per mimare le funzionalità dei semi per la semina e per la capacità posseduta di evolversi in piantine in condizioni di *vitro* o *ex vitro* e che possono essere conservati anche mediante stoccaggio” (Redenbaugh, 1993; Capuano *et al.*, 1998; Ara *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2009). Di conseguenza, è anche possibile incapsulare direttamente meristemi isolati da piante coltivate *in vivo*, secondo quanto riportato da Pattnaik *et al.*, (1995), i quali hanno usato gemme direttamente recise da alberi maturi per l’allestimento dei semi sintetici. Di recente, Micheli *et al.* (2007) e Micheli e Standardi (2009) hanno proposto la capsula come ulteriore prodotto della tecnologia di incapsulamento, la quale può essere definita come “una porzione di tessuto vegetale *vitro*-derivato che può essere utilizzato per la micropropagazione dopo stoccaggio e/o trasporto”. Per realizzare le capsule od i semi sintetici la procedura adottata è la stessa ed include tre passi successivi: rivestimento, complessazione e lavaggio. Il rivestimento è un singolo processo realizzato inserendo il propagulo, reciso dalle colture *in vitro*, in un gel o soluzione incapsulante per pochi secondi. In genere, l’alginato di sodio è la sostanza maggiormente impiegata per tale operazione, in quanto possiede una moderata viscosità, bassa tossicità per gli espianti, basso costo e caratteristiche biocompatibili. E’ inoltre ampiamente impiegato poiché provvede a proteggere meglio gli espianti incapsulati contro rischi di natura meccanica, in dipendenza dalla sua concentrazione, dal livello di viscosità o dal tipo commerciale oltre che dalle condizioni di complessazione. Tuttavia, in sostituzione dell’alginato di sodio, molte sostanze sono state testate come agenti incapsulanti, come ad esempio l’alginato di sodio con gelatina, gomma adragante, gomma di guar, pectato di sodio, alginato di potassio, carbossimetil cellulosa, carragenina, ecc. (Redenbaugh *et al.*, 1993; Rai *et al.*, 2009; Saiprasad, 2001). Per la complessazione, la quale conferisce durezza alle capsule, gli espianti rivestiti di

alginato sono immersi in una soluzione di cloruro di calcio per 30-40 minuti. Un processo di scambio ionico avviene durante questa fase, conseguente alla sostituzione dello ione Na^+ con il Ca^{++} con formazione di alginato di calcio (Ara *et al.*, 2000; Redenbaugh e Walker, 1990). Così, il rivestimento acquisisce la consistenza necessaria per assicurare protezione contro i danni meccanici e i rischi di disidratazione. L'indurimento delle capsule di alginato di calcio è influenzato dalla concentrazione di alginato di sodio e del cloruro di calcio e può anche variare in base al tempo di complessazione. Di solito, ad una maggiore consistenza corrisponde una buona protezione durante il trasporto e manipolazione, ma l'espianto presenta maggiori difficoltà a rompere il rivestimento. Infine, il terzo passo è costituito da diversi successivi risciacqui in endosperma sterile per rimuovere gli ioni residui tossici di cloruro e sodio. Dopo il lavaggio, tali propaguli incapsulati possono essere conservati o trasferiti sul mezzo di semina. In ogni caso, è necessario che gli espienti incapsulati mantengano 3 requisiti fondamentali, ovvero:

- la vitalità (% di espienti di aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti);
- la ripresa (% di microtalee incapsulate che producono germogli di lunghezza superiore > di 4 mm);
- la conversione (emergenza di germogli e radici lunghe almeno 4 mm dalle microtalee incapsulate).

Per soddisfare queste condizioni, le due soluzioni impiegate per il rivestimento e la complessazione, oltre all'acqua di risciacquo vengono arricchite di sostanze nutritive e di regolatori della crescita (Capuano *et al.*, 1998). La composizione della soluzione nutritiva può essere simile a quella impiegata per la fase di proliferazione *in vitro*, ma di solito tutti i componenti sono addizionati a metà concentrazione. Questa soluzione è chiamata endosperma artificiale, in quanto fornisce nutrimento all'espianto incapsulato, specialmente durante il suo stoccaggio e la ripresa, oltre a svolgere una funzione protettiva (Carlson e Hartle, 1995; Gardi *et al.*, 1999).

Molti gruppi di ricerca stanno lavorando sull'incapsulamento di embrioni somatici di diverse specie inclusi cereali, alberi da frutto, ortive, piante ornamentali, officinali, e specie da forestazione. Allo stato attuale, sono disponibili efficienti protocolli per produrre ed incapsulare embrioni somatici di erba medica, cavolo, carota, sedano, pomodoro, lattuga, cotone, frumento, pino, riso, soia, anguria, agrumi, che possono essere di supporto per l'applicazione commerciale in vivaio, soprattutto quando utilizzati per la diffusione di genotipi nuovi o di valore (Bapat e Rao, 1988; Suehara *et al.*, 1995; Onay *et al.*, 1996; Akhtar, 1997; Castillo *et al.*, 1998; Ara *et al.*, 1999; Germanà *et al.*, 1999, 2007; Wu *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2006; Cangahuala-Inocente *et al.*,

2007; Singh *et al.*, 2007; Aquea *et al.*, 2008; Pintos *et al.*, 2008; Rai e Jaiswal, 2008; Rai *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2013; Teixeira da Silva, 2012; Utomo *et al.*, 2008; Cartes *et al.*, 2009). Tuttavia l'uso degli embrioni somatici come espianti incapsulati per la produzione di seme sintetico è limitato poiché in diverse specie questo processo rigenerativo comporta rischi di:

- variazione somaclonale;
- asincronismo durante la formazione e maturazione degli embrioni somatici;
- embriogenesi ricorrente (Kim e Janick, 1990).

Mentre diversi gruppi di ricerca stanno cercando delle soluzioni a questi inconvenienti, una nuova prospettiva si è aperta negli ultimi anni nella tecnologia del seme sintetico con l'uso di espianti non embriogenici (unipolari) ottenuti attraverso organogenesi diretta *in vitro* oppure attraverso la proliferazione di gemme ascellari. In merito all'uso degli espianti unipolari per l'incapsulamento, generalmente vengono adoperate porzioni uninodali di 3-4 mm di germogli con gemme terminali o laterali, recise durante o alla fine di una subcoltura; in genere esse vengono chiamate microtalee. In questi espianti l'assenza del primordio della radice è accoppiata con l'incapacità di formare radici avventizie spontaneamente rappresentando il maggior problema per ottenere la conversione del seme sintetico. Studi condotti su specie vegetali caratterizzate da una capacità rizogena bassa o media, come ad esempio alcune cultivar di melo e portinnesti, olivo, kiwi e pesco, ha permesso di sviluppare una procedura per indurre l'emissione delle radici, al fine di ottenere microtalee incapsulate con capacità di conversione (Capuano *et al.*, 1998; Micheli *et al.*, 2006; Standardi e Piccioni, 1997, 1998; Adriani *et al.*, 2000; Micheli *et al.*, 2002; Romay *et al.*, 2002; Lucaccioni *et al.*, 2005). Questo protocollo è stato sviluppato nel laboratorio di colture *in vitro* del Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali e consta di 6 fasi successive: asportazione delle microtalee, induzione radicale, iniziazione del primordio radicale, incapsulamento, semina e conversione. Come già detto, uno dei prodotti della tecnologia dell'incapsulamento è la capsula, la quale è uno strumento efficace per lo scambio di materiale vegetale elite axenico (germoplasma) a causa delle sue ridotte dimensioni e della facilità di manipolazione (Redenbaugh, 1993; Naik e Chand, 2006; Rai *et al.*, 2008). Di contro, la scarsa conversione osservata in alcune specie attraverso la realizzazione di semi sintetici per mezzo di espianti unipolari, come ad esempio gli agrumi, attribuibile ad una serie di fattori (genotipo, formulazioni nutritive inadeguate connesse all'endosperma artificiale od al mezzo di semina, procedure inefficaci per indurre la radicazione nelle microtalee), ne limita fortemente l'utilizzazione. Quando la sperimentazione avrà messo a punto il protocollo di incapsulamento più idoneo per ciascun genotipo, anche attraverso la biotizzazione con l'inserimento ad esempio

di funghi micorrizici arbuscolari (AMF) o dei Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) all'interno del seme sintetico, si potrà verosimilmente usufruire massivamente di tale strumento biotecnologico nel settore vivaistico.

1.3 Applicazioni della coltura *in vitro*

Le possibili applicazioni della coltura *in vitro* riguardano essenzialmente il risanamento da patogeni, la conservazione del germoplasma ed il miglioramento genetico.

1.3.1 Coltura in vitro per il risanamento da patogeni

Termoterapia

La termoterapia è il metodo più comunemente adoperato per l'eradicazione del CTV e di altri virus e consiste nella combinazione della termoterapia e della coltura di apici meristematici (Anif *et al.*, 2005; Horst e Klopmeier, 1993; Desjardins *et al.*, 1957; Calavan *et al.*, 1972; Roistacher e Calavan, 1974b). Il successo della termoterapia si basa sull'incapacità del virus (o dei virus) di riprodursi e di propagarsi rapidamente all'interno di piante esposte ad una temperatura dell'aria di 35-40°C (Grondeu e Samson, 1994). I tempi del trattamento termico possono variare da settimane a mesi in funzione della cultivar e dello specifico virus.

Coltura di meristemi apicali

E' una tecnica molto efficace che consiste nell'eliminazione dei virus da piante colpite attraverso il prelievo dei meristemi apicali da piante allevate ad alte temperature. Tale tecnica si basa sul fatto che il meristema apicale isolato permette di escludere il virus dalla "nuova" pianta poiché proviene da un germoglio sviluppatosi sulla pianta madre a temperature che inibiscono la crescita del virus. Ovviamente, minore è la dimensione del meristema apicale, maggiori saranno le possibilità di escludere il virus. Di contro, al diminuire della dimensione dell'espianto si riducono le sue probabilità di sopravvivenza in coltura di tessuti. La dimensione del meristema dovrà essere la massima possibile entro i limiti che ne consentano il risanamento; in pratica, lo spessore dell'espianto dovrebbe variare da 0,2 a 0,5 mm a seconda della specie da risanare e del virus da eliminare.

Embriogenesi somatica

Negli ultimi anni, accanto alle tradizionali tecniche di risanamento da virus, quali la termoterapia e la coltura di apici meristematici, l'embriogenesi somatica si è dimostrata un valido strumento alternativo di grandi potenzialità "sanitarie", sebbene non di semplice applicazione. Com'è noto, l'embriogenesi somatica consiste nella differenziazione di embrioni da tessuti di diversa origine, quali foglie, parti del fiore immaturo, internodi, ecc. L'embriogenesi somatica è ampiamente

utilizzata per molte specie da frutto, per la rigenerazione a partire da cellule sottoposte a trasferimento genico. Embrioni somatici possono altresì essere usati come espianti da sottoporre a crioconservazione e come potenziale fonte di variabilità somaclonale. A partire dagli anni '90 un gruppo di ricercatori sudafricani, lavorando su vite, si accorsero che le piante derivate da embrioni somatici risultavano esenti da virus, limitatamente a quelli floematici. Alcuni anni più tardi, anche grazie alla disponibilità di efficaci protocolli di rigenerazione per molte specie e cultivar, la tecnica è stata applicata con successo a *Citrus*, canna da zucchero e cacao (Gribaudo e Gambino, 2010). Indubbiamente la rigenerazione per embriogenesi somatica presenta ancora grossi vincoli (i tempi lunghi, la forte dipendenza dal genotipo, la *trueness-to-type* delle piante rigenerate da accertare) che ancora non le permettono di affiancarsi alle tecniche tradizionali di risanamento nelle applicazioni di routine.

Microinnesto *in vitro*

E' stato applicato per la prima volta nel risanamento degli agrumi (Murashige *et al.*, 1972; Russo e Starrantino, 1973; Navarro, 1979). Tale metodo sfrutta il fatto che i tessuti meristematici sono nella maggior parte dei casi esenti da infezioni virali. Il microinnesto si differenzia dalla coltura di apici meristematici, in quanto la porzione di tessuto meristematico, una volta recisa dall'apice vegetativo, invece di essere posta direttamente sul substrato di coltura, viene innestata su portinnesti virus-esenti, allevati *in vitro*. Una volta eseguito l'innesto e verificato l'avvenuto attecchimento, occorrono 60-70 giorni per ottenere una piantina completamente ambientata. Tale tecnica, sebbene non particolarmente sofisticata, richiede elevata manualità (De Paoli *et al.*, 1994).

1.3.2 Conservazione del germoplasma

I semi delle specie vegetali vengono tradizionalmente conservati in banche del seme, in camere fredde mantenute alla temperatura, in genere, di $-18^{\circ}/-20^{\circ}\text{C}$. In conservazione, la longevità del seme dipende da fattori intrinseci ed estrinseci e, inoltre, da meccanismi di protezione e riparazione dai danni eventualmente prodotti dalle basse temperature. A secondo del comportamento dei semi sottoposti a disidratazione vengono distinti tre gruppi: semi tolleranti alla disidratazione (semi ortodossi), semi intermedi (semi sub-ortodossi) e semi sensibili alla disidratazione (non ortodossi o recalcitranti). A causa dei tempi limitati di conservazione dei semi recalcitranti, la crioconservazione di semi interi o embrioni isolati rappresenta un valido strumento per la conservazione a lungo termine del germoplasma di specie a propagazione gamica, caratterizzate da semi sub- o non-ortodossi.

La crioconservazione permette di conservare il materiale vegetale in condizioni di temperatura ultra-bassa per tempi illimitati. La conservazione viene effettuata con organi e tessuti vegetali immersi in azoto liquido, cioè alla temperatura di -196°C , oppure mantenuti nei suoi vapori, a circa -160°C . A queste temperature non si ha alcuna attività biochimica cellulare e, di conseguenza, è bloccata la crescita biologica e lo sviluppo degli organi o tessuti, senza che ne sia compromessa la sopravvivenza. I semi, prima dell'immersione in azoto liquido, devono essere opportunamente ridotti nel loro contenuto in acqua a valori, in genere, inferiori al 25%. La disidratazione viene condotta mediante esposizione dei semi per tempi definiti sotto il flusso d'aria sterile di una cappa a flusso laminare, oppure in contenitori ermeticamente chiusi, contenenti gel di silice o una soluzione acquosa satura di un sale potassico (acetato, idrossido o carbonato di potassio). La conservazione in azoto liquido si opera ponendo i semi in crioprovette da 2 cc (*cryovials*) che vengono, a loro volta, inserite in scatole di plastica da criogenia (*cryoboxes*). Le scatole vengono quindi poste all'interno di appositi contenitori per azoto liquido. Dopo il recupero dall'azoto liquido e lo scongelamento in bagno termostato, i semi sono posti a germinare *in vitro*. In questa fase, la coltura *in vitro* svolge un importante ruolo, in quanto la scelta del substrato più idoneo e l'applicazione di opportune condizioni di coltura (temperatura, illuminazione e fotoperiodo) possono favorire la germinazione dei semi sopravvissuti alla crioconservazione e il primo sviluppo dei semenzali.

E' da rilevare che la crioconservazione dei semi si presta, oltre che alla conservazione di specie a propagazione gamica, anche alla conservazione clonale di specie da frutto caratterizzate dalla contemporanea presenza nel seme dell'embrione zigotico e di embrioni nucellari. E' questo il caso del genere *Citrus*, all'interno del quale si annoverano molte specie poliembrioniche. In tal senso, una recente applicazione della crioconservazione ha riguardato lo studio condotto dal CNR-IVALSA di Sesto Fiorentino (Firenze) su un'antica collezione Medicea di agrumi, svolto in collaborazione con la Soprintendenza Speciale per il Patrimonio Storico, Artistico ed Etnoantropologico e per il Polo Museale della Città di Firenze (De Carlo e Lambardi, 2005; Lambardi e De Carlo, 2009).

1.3.3 Coltura *in vitro* per il miglioramento genetico

Coltura di embrioni (embriocoltura)

L'embrione zigotico rappresenta il primo stadio di sviluppo di un nuovo genotipo che deriva dalla fusione del gamete femminile con quello maschile. Uno dei motivi per cui è stata intrapresa la tecnica della coltura *in vitro* di embrioni zigotici è da ricondurre sostanzialmente alla

riduzione dei tempi del miglioramento genetico. L'embriocoltura è stata applicata con successo già nel 1925 da Laibach, su *Lilium perenne* e *Lilium austriacum* per il recupero di ibridi interspecifici.

Nel genere *Citrus*, la coltura di embrioni intraspecifici di cultivar poliembrioniche ha permesso, inoltre, il recupero di embrioni zigotici che spesso non sopravvivono alla competizione intraovulare degli embrioni nucellari più vigorosi. Altra applicazione dell'embriocoltura è quella del superamento della dormienza dei semi di alcune piante, specialmente per quelle arboree caratterizzate da una maturazione precoce dei frutti. Ad esempio, su pesco sono state ottenute nuove varietà utilizzando la germinazione in vitro di embrioni immaturi derivanti dall'incrocio di due genitori a maturazione molto precoce (Ramming, 1983; Fideghelli *et al.*, 1986).

Ottenimento *in vitro* di piante aploidi

La produzione di piante aploidi *in vitro* costituisce un metodo rapido per l'ottenimento di piante omozigoti da utilizzare nei programmi di miglioramento genetico. Le piante omozigoti possono essere utilizzate in quanto portatrici di caratteri recessivi interessanti o per l'ottenimento di linee pure da impiegare nella produzione di ibridi. Come materiale di partenza vengono utilizzate le cellule gametiche a numero cromosomico aploide (polline ed ovulo). L'instabilità delle cellule aploidi e la loro tendenza, durante la coltura del callo, a duplicare il corredo cromosomico, permette di ottenere direttamente piante diploidi omozigoti e fertili. Quando invece, si ottengono individui aploidi e sterili, è necessario indurre il raddoppiamento cromosomico con colchicina, sostanza che agisce come inibitore del fuso mitotico e può essere applicata, sia su germogli in vitro sia sulle piante adulte con trattamento alle gemme ascellari in pasta di lanolina (De Paoli *et al.*, 1994). I vantaggi offerti da tale tecnica sono la drastica riduzione del tempo di ottenimento di linee pure in specie con lungo periodo giovanile o la possibilità di ottenere omozigoti in piante auto-incompatibili. La tecnica più frequentemente adoperata per la produzione di piante aploidi è la coltura di antere. Questa, oltre ad essere il principale strumento per il raggiungimento dell'omozigosi nelle piante arboree (Germanà, 1997, 2006), è anche un mezzo efficace per ottenere una fonte di callo somatico altamente embriogenico (Germanà, 2003; Germanà *et al.*, 2005).

Coltura e fusione dei protoplasti

Tra i vari strumenti biotecnologici, la coltura e la fusione dei protoplasti ha trovato varie applicazioni, agrumi compresi. I protoplasti sono cellule vegetali prive di parete cellulare. In genere si ottengono mediante trattamento enzimatico (cellulasi e pectinasi) che digeriscono la parete cellulare. La fusione dei protoplasti appartenenti a specie diverse consente l'ottenimento di ibridi somatici, unendo genotipi che difficilmente o non si potrebbero combinare

sessualmente. Per fondere i protoplasti di specie differenti occorre adoperare metodologie che mirano a questo scopo. In particolare, i protoplasti possono essere fusi mediante l'utilizzo di composti chimici, come ad esempio il polietilene glicole (PEG) oppure mediante impulsi elettrici (elettrofusione). Il PEG, di peso molecolare compreso tra 1500 e 6000, è solubile in acqua e viene adoperata in soluzione con sali di calcio e pH alcalino. Poiché si tratta di una molecola assai lunga e dotata di cariche negative libere, essa agisce da ponte tra protoplasti contigui. Lo ione Ca^{++} , invece, presente in soluzione, forma un ponte tra le proteine di membrana polarizzate negativamente e il PEG. Quest'ultimo viene poi rimosso mediante diluizione con conseguente dispersione delle molecole ponte. Ciò determina una ridistribuzione delle cariche su zone di unione di membrane di protoplasti contigui, che inducono la fusione. Grazie alla fusione dei protoplasti sono stati trasferiti caratteri molto importanti dal punto di vista agronomico come la resistenza al mosaico del tabacco nel tabacco, la resistenza al virus X nella patata, la sterilità citoplasmatica nel tabacco, la resistenza all'atrazina nella patata e in alcune specie del genere *Brassica* (Lorenzetti e Salamini, 1989).

Mutagenesi e selezione precoce

La coltura in vitro viene impiegata nel miglioramento genetico anche per aumentare la variabilità all'interno di una specie. Spesso, la rigenerazione attraverso la formazione di callo porta alla produzione di piante geneticamente diverse per caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche. La coltura *in vitro*, pertanto, oltre ad indurre variabilità somaclonale, porta alla propagazione di mutanti che sarebbero incapaci di sopravvivere in condizioni naturali. Nelle piante a riproduzione gamica i trattamenti mutageni si effettuano principalmente su seme o su polline. L'utilizzo del polline offre alcuni vantaggi quali la possibilità di lavorare con grandi quantità di materiale in spazi ridotti e di utilizzare anche le radiazioni ultraviolette (U.V.). Inoltre, fecondando una pianta portaseme demasculata coi granuli pollinici mutagenizzati, si possono ottenere piante interamente eterozigoti per la mutazione. Un limite è che il trattamento va effettuato in loco, o non a grandi distanze, in quanto il trasporto e la conservazione del polline risulta in genere abbastanza complesso. Il seme al contrario può essere facilmente inviato a centri appositi per la mutagenesi e conservato per un certo periodo prima di essere impiegato, inoltre è una struttura più resistente del polline e subisce quindi meno danni fisiologici in seguito a certi trattamenti. Nel caso di specie a propagazione vegetativa, si trattano parti di pianta (marze o talee), provviste di gemme contenenti gli apici meristematici, in grado di dividersi attivamente originando i vari organi della pianta. Le gemme sono strutture multicellulari e, come nel caso del trattamento ai semi, si ha quindi la formazione di chimere di vario tipo; per ottenere un mutante non chimerico si possono prelevare cellule solo dal settore gemmario mutato e, ove possibile,

rigenerare la pianta tramite coltura. L'agente mutageno può essere di due tipi: fisico e chimico. Nel primo caso si utilizzano radiazioni ionizzanti e non ionizzanti. Nel secondo si usano vari composti chimici che, sebbene siano efficaci nell'indurre mutazioni, provocano contemporaneamente un'elevata letalità, riducendo l'efficienza del trattamento. In generale si distinguono tre classi principali di mutageni chimici in base al loro meccanismo d'azione: 1) *Analoghi di base*, in questa classe rientrano come composti il 5-bromouracile e la 2-aminopurina; 2) *Agenti intercalanti*, in cui ritroviamo come composti le acridine o il bromuro d'etidio; 3) *Agenti alchilanti*, nell'ambito di questa classe si ritrovano alcune delle sostanze più usate per la mutagenesi delle piante coltivate: l'etilmetansulfonato (EMS), molto usato in *Arabidopsis thaliana*, il dietilsolfato (dES), l'etilenimina (EI), la nitrosoguanidina (NG), l'etilenitrosourea (ENU) e la metilnitrosourea (MNU).

Trasformazione genetica

Le tecniche di trasformazione genetica consentono al breeder di inserire negli organismi viventi, caratteri di interesse, anche agronomico, ottenendo nuovi genotipi in un'unica generazione. Il breeder, inoltre, può decidere in quale organo, con quale vigore ed in risposta a quale segnale endogeno o esogeno il nuovo carattere deve esprimersi.

Alle potenzialità delle nuove tecniche di ingegneria genetica, si contrappongono i numerosi problemi che ancora devono essere risolti; infatti, molti geni che determinano caratteri agronomicamente rilevanti non sono facili da individuare e da isolare, l'espressione di un gene spesso dipende più dalla posizione nel genoma della pianta ospite in cui esso si integra che dal reale segnale di espressione, inoltre, le tecniche di trasferimento genico richiedono un notevole impiego di manodopera e di capitali, per poter ottenere pochi individui rispondenti alle esigenze iniziali.

L'ingegneria genetica è particolarmente utile nel miglioramento genetico delle piante arboree poiché permette di accelerare i tempi di rilascio di nuove cultivar, superando l'elevato livello di eterozigosi e la lunghezza del periodo giovanile che le caratterizza.

I principali obiettivi dell'ingegneria genetica per le piante arboree sono: l'introduzione del carattere resistenza a stress biotici e abiotici e il controllo dell'attività vegetativa e produttiva degli alberi in relazione soprattutto ad aspetti relativi alla qualità dei frutti.

Le tecniche di ingegneria genetica che hanno raggiunto un tale livello di riproducibilità e applicabilità pratica da essere raccomandate per progetti futuri sono: il trasferimento mediato da *Agrobacterium*, l'inserimento diretto del DNA in protoplasti e il metodo biolistico. Oltre a queste tecniche, ne esistono altre utilizzate più raramente e sono l'elettroporazione ed incubazione con fusogeni e la microiniezione.

2. La biotizzazione

La biotizzazione consente di proteggere le piante dagli stress ambientali e di incrementare la sostenibilità delle produzioni vegetali attraverso l'uso di microrganismi utili, quali alcuni funghi simbionti micorrizici arbuscolari (AMF) e alcuni Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB). Nel campo della micropropagazione, l'utilizzo di tali microrganismi può avvenire sia durante la fase di *vitro* che durante il passaggio all'*ex-vitro*.

2.1 I funghi micorrizici arbuscolari (AMF)

Viene definita micorriza arbuscolare l'associazione simbiotica e mutualistica che s'instaura tra le piante ed una grande varietà di funghi appartenenti al phylum *Glomeromycota* (Schubler *et al.*, 2001; Schubler, 2002). I funghi micorrizici arbuscolari sono microrganismi ubiquitari del suolo che costituiscono parte integrante degli ecosistemi terrestri in quanto formano associazioni simbiotiche con il sistema radicale di oltre l'80% di tutte le specie vegetali presenti in natura, incluse molte specie di interesse economico e commerciale. Le piante ospiti degli AMF sono principalmente angiosperme, alcune gimnosperme, pteridofite, licopodi e muschi (Smith e Read, 1997). La reciprocità presuppone una relazione benefica per entrambi gli organismi coinvolti: il fungo colonizza le radici della pianta, fornendole nutrienti minerali e acqua, che assorbe dal suolo attraverso la sua rete esterna di ife, mentre la pianta fornisce al fungo substrati energetici e carboidrati derivati dalla via fotosintetica (Hernández-Dorrego, 2002). In natura esistono diversi tipi di micorrize: Ectomicorrize, Ectoendomicorrize ed Endomicorrize. Quest'ultime a loro volta si suddividono in Ericoidi, Orchidoidi, ed Arbuscolari. Le micorrize arbuscolari sono costituite da funghi che appartengono alla classe *Zygomycetes*; questi si caratterizzano perché producono, durante il loro ciclo vitale, strutture conosciute come *arbuscoli* (tutti) e *vescicole* (la maggioranza di essi). Gli arbuscoli, sono ramificazioni simili ad austori formati all'inizio dell'associazione, e risultano formate da ripetute ramificazioni dicotomiche di ife fungine all'interno delle cellule radicali. Sono considerate le strutture primarie coinvolte nel trasferimento bidirezionale dei nutrienti tra il fungo simbionte e la pianta ospite. Il loro ciclo vitale si arresta dopo 4-15 giorni, al termine dei quali il plasmalemma della cellula ospite s'invagina incorporando le ramificazioni fungine. Le vescicole, sono strutture globulari o sferiche, di colore scuro, che si formano in seguito. Esse si presentano come dei gonfiori terminali o intercalari di ife fungine situate sia a livello intercellulare (di forma irregolare, con pareti sottili), sia intracellulare (più rotondeggianti e pareti più spesse). Durante i primi stadi di sviluppo, il citoplasma delle vescicole si presenta moderatamente denso, multinucleato contenente piccoli globuli di lipidi e granuli di polifosfati i quali sono utilizzati dalla pianta in

condizioni di carenza. Il contenuto in lipidi aumenta progressivamente con la maturazione, fino ad occupare l'intero lume delle vescicole. La visualizzazione di tali strutture è possibile soltanto attraverso opportune colorazioni e l'utilizzo dello stereomicroscopio e del microscopio ottico. L'infezione della radice dell'ospite è intrapresa dalle ife effuse dagli sporocarpi, da una clamidospora, da una vescicola interna o da altri propaguli presenti nei residui radicali. L'infezione s'instaura in seguito al riconoscimento tra i due potenziali partner, durante il quale il fungo cresce sulla superficie della radice dell'ospite. La coltura *in vitro* di tali funghi ha, infatti, dimostrato la necessaria presenza della radice per la crescita del micete, ipotizzando una funzione di stimolo da parte degli essudati radicali, prodotti dalla pianta, prima ancora del contatto fisico con la radice stessa. La penetrazione dell'epidermide della radice è spesso preceduta dalla formazione di un appressorio. Appare chiaro dunque il ruolo benefico svolto dalle micorrize nei confronti delle piante ospiti, come evidenziano i numerosi studi in materia (Schenck, 1981; Harley e Smith, 1983; Abbott e Robson, 1986; Pflieger e Lindermann, 1996). Oltre a questa relazione trofica diretta pianta – fungo micorrizogeno, che assicura il rifornimento di acqua ed elementi nutritivi, gli AMF possono, al contempo, indurre tolleranza alla salinità ed ai patogeni radicali e migliorare la struttura del terreno.

Le micorrize sono, dunque, fattore vitale fondamentale per il funzionamento degli ecosistemi terrestri, per il mantenimento della biodiversità vegetale, per la struttura della comunità microbica e per il ciclo delle sostanze nutritive (Van der Heijden *et al.*, 1998; Smith e Read, 2008). Diversi studi sono stati effettuati in merito all'interazione fungo-radici della pianta ospite e da questi è scaturito che numerosi sono gli effetti che le micorrize arbuscolari esercitano sulla crescita delle piante. L'effetto più importante dovuto all'azione degli AMF sulle piante è un incremento dell'assorbimento di nutrienti minerali dal suolo, che si traduce in una maggiore crescita e in un maggior sviluppo delle stesse. L'espansione del micelio esterno del fungo oltre la rizosfera è il motivo principale di questo effetto, in quanto permette la captazione dei nutrienti al di fuori della zona d'azione delle radici, ormai impoverita dall'assorbimento fisiologico della pianta (Jakobsen *et al.*, 1992; Sanders e Tinker, 1973). Il ruolo della simbiosi è fondamentale per l'assorbimento degli elementi minerali a lenta diffusione nel suolo, come i fosfati solubili, lo zinco e il rame (Gorge *et al.*, 1992). Studi hanno dimostrato che la micorizzazione favorisce anche l'assorbimento dell'azoto (Barea e Azcón-Aguilar, 1987). Inoltre la concentrazione di elementi come il potassio e il magnesio risulta essere più alta nelle piante micorrizzate (Sieverding, 1991). Anche l'assorbimento del calcio è stimolato dalla simbiosi con gli AMF (Plenchette *et al.*, 1983). Invece i microelementi zinco, rame e boro sono attivamente assorbiti dalle ife del fungo e trasportati fino all'ospite (Gianinazzi-Pearson e Gianinazzi, 1983). La

simbiosi con la micorriza arbuscolare determina altri effetti, quali: l'aumento della resistenza della pianta allo stress idrico e alla salinità, un aumento della resistenza e/o tolleranza a determinati patogeni del suolo, un incremento della traspirazione e un incremento della fissazione dell'azoto nelle leguminose (Gerdemann, 1968; Linderman, 1992; Smith, 1987; Roncadori, 1997). Sulle piante micorrizzate, quindi, si produce un aumento del contenuto d'acqua, che è imputabile sia ad un aumento della conduttività idrica della pianta, sia ad una diminuzione della resistenza al flusso di acqua attraverso essa. Inoltre ciò può essere anche dovuto ad un maggiore assorbimento della rete di ife esterne del fungo AMF, estese oltre la zona alla quale il sistema radicale ha un accesso diretto. La pianta fa un migliore uso dell'acqua ed è capace di recuperare più velocemente in caso di stress idrico (Cooper, 1984). Si è dimostrato che i funghi costituenti micorrize arbuscolari producono, inoltre, un effetto positivo sulle caratteristiche pedologiche. Una pianta micorrizzata che cresce in un suolo ricco di sabbia è capace di aggregare, per unità di massa, più particelle di suolo intorno alle sue radici rispetto ad una pianta non micorrizzata (Sieverding, 1991).

Gli effetti benefici dovuti all'introduzione dell'inoculo artificiale micorrizico risultano più evidenti nei suoli dove le popolazioni di AMF nativi non esistono o sono state eliminate mediante il ricorso a pratiche agricole ostacolanti il loro sviluppo (come la fumigazione eccessiva del suolo e la coltivazione intensiva). La micorrizzazione delle piante in fase di preimpianto può risultare interessante anche nelle situazioni dove la quantità di inoculo AMF nel suolo agrario è molto bassa o dove la coltivazione precedente all'impianto non svolgeva funzione ospitante, e/o dove le popolazioni autoctone non siano sufficientemente infettive ed efficaci (Rhodes, 1984; Sieverding, 1991). Si è dimostrato un effetto benefico dovuto all'inoculo, prima dell'impianto, nella maggior parte delle coltivazioni orticole e nella coltivazione degli agrumi (Camprubi 1994; Cooper e Grandison, 1986; MacGuidwin *et al.*, 1985; O'Bannon e Nemec, 1979; Smith e Kaplan, 1988). L'uso di formulati commerciali a base di inoculo micorrizico ha dimostrato, per numerose specie orticole e da frutto, di avere una serie di effetti positivi, che si traducono su un maggior tasso di sopravvivenza delle piantine *vitro*-derivate in fase di acclimatazione e post-acclimatazione (Cassells *et al.*, 1996; Krishna *et al.*, 2005; Monticelli *et al.*, 2000; Padilla ed Encina, 2005; Morone Fortunato *et al.*, 2005; Estrada-Luna e Davies Jr., 2003). Gli agrumi, allevati in pieno campo, presentano un minor numero di peli radicali e la loro crescita dipende fortemente dagli AMF (Davies e Albrigo, 1994; Wu e Xia, 2006). Un gran numero di esperimenti effettuati in pien'aria ed in contenitore hanno dimostrato che l'inoculazione con gli AMF può aumentare sia la crescita che l'assorbimento dei nutrienti delle piante di agrumi migliorando la tolleranza a condizioni di stress, quali la siccità e la salinità oltre

a migliorare la qualità dei frutti (Wu e Zou, 2009; Wu *et al.*, 2010 a, 2011 b). Un esperimento condotto da Wu *et al.*, (2011), su piantine *vitro*-derivate di *Citrus tangerina*, ha dimostrato la migliore efficacia dell'inoculo di *Glomus mosseae* rispetto a quello di *G. versiforme* e al controllo (senza inoculo micorrizico), in merito ai principali parametri biometrici (n° di foglie per pianta, altezza e diametro del fusto, area fogliare, peso secco del fusto e delle radici). *G. mosseae* ha inoltre influito positivamente sul tasso di fotosintesi e di traspirazione, della conduttanza stomatica e la temperatura fogliare. In letteratura, esiguo è il numero di lavori che descrivono la micorizzazione nei citrange e numerosi aspetti di quest'associazione rimangono ancora inesplorati. Secondo uno studio condotto da Nemec (1978) sulla micorizzazione di diversi portinnesti degli agrumi, il citrange Troyer è risultato essere quello meno dipendente da tale associazione. Il test è stato condotto su terreno fumigato ed è stato osservato che il citrange Troyer, inoculato con AMF, non aveva lo stesso tasso di crescita dei più dipendenti mandarino Cleopatra e arancio amaro, piuttosto la sua crescita migliorava in assenza di micorrize. Il portainnesto ha mostrato, nello stesso studio, di poter assimilare e accumulare il fosforo in soluzione, anche se in concentrazioni sub-ottimali e in assenza di associazioni micorriziche, a conferma della sua scarsa micorriza-dipendenza. Inoltre è stato rilevato che, in altri portinnesti di agrumi micorizzati, il rapporto radice/germoglio (R/S) era minore di 1,0 (peso della parte apicale maggiore del peso delle radici), mentre citrange Troyer non inoculato mostrava valori maggiori di 1,0. Altre cultivar con basso grado di dipendenza producono più radici, presentando un valore elevato del rapporto R/S o radici molto più sottili. Le variazioni, a volte contrastanti, nella risposta dei citrange alla micorizzazione, sono probabilmente collegate ad una serie di altri fattori, edafici e/o abiotici, che intervengono sulla simbiosi. La metodologia più comunemente utilizzata per effettuare l'inoculo dei funghi formanti micorrize arbuscolari consiste nel depositare una determinata quantità di inoculo sotto il sistema radicale della pianta che si vuole micorizzare. Le quantità di inoculo da impiegare dipendono dalla grandezza, dall'età della pianta e dal luogo dove verrà coltivata, oltre che dal tempo in cui si desidera che si costituiscano le simbiosi; questo implica che, con una maggiore quantità di inoculo impiegata, si avrà una più veloce colonizzazione della radice. E' anche possibile mescolare l'inoculo con lo strato di coltivazione, ma in questo caso la quantità di inoculo da impiegare sarà ovviamente maggiore. Il contatto diretto fra l'apparato radicale della pianta e le propaggini del fungo permette una più veloce colonizzazione della radice (Hernández-Dorrego, 2002).

2.2 I Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)

I batteri promotori della crescita (PGPB) sono dei microrganismi che vivono nel suolo, a livello della rizosfera, e che sotto alcune condizioni risultano benefici per le piante. I PGPB svolgono un'azione diretta sul metabolismo delle piante poiché provvedono a rifornirle di sostanze di cui solitamente scarseggiano. Essi sono in grado di fissare l'azoto atmosferico, di rendere solubili elementi utili per la pianta come il fosforo ed il ferro e di produrre fitormoni, come auxine, gibberelline, citochinine ed etilene. Inoltre, questi batteri migliorano il grado di tolleranza delle piante a stress di varia natura come ad esempio la siccità, l'elevata salinità, la tossicità dei metalli e l'azione dei pesticidi. Numerosi sono i batteri che svolgono un'azione benefica per le piante ed appartengono ai generi *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Serratia*, ecc. (Bashan e de-Bashan, 2005). I PGPB svolgono anche un'azione di biocontrollo: promuovendo indirettamente la crescita delle piante le prevengono da effetti deleteri causati dai microrganismi fitopatogeni (batteri, funghi e virus). Essi producono sostanze che sono dannose o che inibiscono altri microrganismi, ma non le piante, attraverso la riduzione della disponibilità di alcuni elementi come ad esempio il ferro, oppure alterando il metabolismo delle piante ospiti incrementando la loro resistenza nei confronti dei patogeni. L'azione antagonista nei confronti dei microrganismi fitopatogeni avviene attraverso la produzione di siderospore, la sintesi di antibiotici, di enzimi e/o di composti fungicidi (Dobbeleare *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004). Studi precedenti hanno dimostrato che i PGPB stimolano la crescita ed incrementano le rese in diverse specie da frutto tra cui melo, ciliegio, agrumi, lampone, mirtillo, gelso ed albicocco (Kloepper, 1994; De Silva *et al.*, 2000; Sudhakar *et al.*, 2000; Esitken *et al.*, 2002, 2003, 2006; Orhan *et al.*, 2006; Aslantas *et al.*, 2007; Karlıdag *et al.*, 2007). Com'è noto, le piantine che provengono da *vitro* sono molto delicate ed uno dei momenti più critici per loro è la fase di acclimatamento. E' pertanto necessario aumentare i livelli di sopravvivenza delle piante micropropagate. L'applicazione di tali microrganismi durante la fase di *vitro* risulta essere più laboriosa e delicata in quanto l'inoculo (spore o frammenti di radici micorrizzate) è suscettibile a contaminazioni di varia natura e pertanto si deve ricorrere a complesse tecniche di sterilizzazione (Eskandari e Danesh, 2010). In letteratura esistono alcuni lavori in merito all'incapsulamento dei PGPB in capsule di alginato di calcio (Young *et al.*, 2006). La matrice gel, grazie alla sua azione catalitica, consente alle cellule microbiche di rimanere vitali. In diversi studi è stato utilizzato l'alginato come materiale incapsulante in presenza di cationi polivalenti che si legano ad unità di catione di acido guluronico (Witter, 1996) in un unico passaggio con sufficiente resistenza meccanica. Inoltre, le capsule di alginato sono capaci di intrappolare un sufficiente numero di batteri (Fenice *et al.*, 2000; Zohar-Perez *et*

al., 2002). L'uso di cellule batteriche incapsulate ha diversi vantaggi in numerose applicazioni ambientali, in quanto favorisce una maggiore protezione da stress di natura biotica (Smit *et al.*, 1996) ed abiotica, come l'azione inibitoria di alcuni composti tossici (Cassidy *et al.*, 1997), una maggiore sopravvivenza ed una migliore attività fisiologica (Weir *et al.*, 1995) e di fornitura di nutrienti additivi incapsulati (Trevors *et al.*, 1993), aumentando così la densità di crescita delle cellule in varie zone preferenziali, aerobiche ed anaerobiche, della matrice gel incapsulante. I PGPB sono stati recentemente adoperati nella tecnologia del seme sintetico (Germanà *et al.*, 2012). In tale lavoro, il ceppo selvatico (WT 1021) di *Sinorhizobium meliloti* e quello modificato (RD64, quest'ultimo in grado di sintetizzare elevate dosi di acido-3-indolacetico, IAA), sono stati inseriti in una matrice di alginato di calcio con microtallee di citrange Carrizo per valutare le loro performance sull'induzione rizogena dei semi sintetici di questo importante portinnesto di agrumi.

3. Gli agrumi

3.1 Origine

Diverse ipotesi sono state formulate sulla storia e l'origine geografica degli agrumi. Sembrerebbe che il genere *Citrus* ed altri generi affini abbiano avuto origine nelle regioni tropicali e subtropicali del Sud-est asiatico: l'India Nord-orientale, la Cina meridionale, la penisola Indo-Cinese e l'arcipelago Malese, per poi diffondersi negli altri continenti (Webber, 1967; Chapot, 1975). Numerosi studiosi hanno ipotizzato il possibile areale di origine degli agrumi: ad esempio Tolkowsky (1938), considerò come centro di origine le regioni montane della Cina meridionale e l'India Nord-orientale; Tanaka (1954) affermò invece che gli agrumi abbiano avuto origine nel Nord-est dell'India e nella regione di Burma, mentre la Cina poteva essere considerata un centro secondario di distribuzione. Inoltre, egli sostenne che diverse specie originate in Cina, si diffusero in Indocina, Malesia, in Asia Nord-orientale per poi giungere in Giappone. Calabrese (1998), riporta la Cina come il nucleo primordiale di origine degli agrumi che lentamente si diffusero verso altri paesi orientali.

3.2 Classificazione

Due diversi sistemi di classificazione sono comunemente accettati per l'inquadramento tassonomico degli agrumi: il sistema di Swingle (1943; 1967) e quello di Tanaka (1954; 1961). Le loro classificazioni rappresentano due diverse concezioni tassonomiche e la loro diversità è evidente anche solo osservando la suddivisione all'interno del genere *Citrus*. Quest'ultimo fu suddiviso da Swingle in due sottogeneri: *Citrus* e *Papeda*, i quali includevano, rispettivamente, 10 e 6 specie. I due sottogeneri furono separati secondo le loro caratteristiche morfologiche e i componenti chimici presenti nei fiori, nelle foglie e nei frutti. In dettaglio, le specie del primo sottogenere presentano fiori profumati con stami raggruppati e un piccolo picciolo non più grande di tre-quarti dell'intera lamina fogliare, mentre il frutto ha una polpa commestibile con oli essenziali amari presenti in ridotte quantità o assenti. Al contrario, i *Papeda* presentano fiori piccoli con stami liberi e separati, grandi piccioli alati che possono talvolta superare in dimensione la foglia stessa; il frutto non è edule per via dell'elevato contenuto in oli amari presenti nella polpa. Nel 1954, Tyozaburo Tanaka suddivise il genere *Citrus* in 2 sottogeneri, *Archicitrus* e *Metacitrus*, 8 sezioni, 13 sottosezioni, 8 gruppi, 2 sottogruppi, 2 microgruppi e 145 specie. Sette anni più tardi, nel 1961, aggiunse al suo sistema di classificazione 2 nuove sottosezioni, un altro gruppo e 12 specie, portando quest'ultime ad un totale di 157. La classificazione di Tanaka è più complessa se paragonata a quella di Swingle a causa del maggior

numero di specie incluse in ogni sottogenere; al contrario, la classificazione di Swingle risulta più facile, anche se non fornisce un'esauriente descrizione della sistematica degli agrumi. Per tale motivo, il sistema di Swingle è il più usato, sebbene in alcuni casi sia stato ampliato includendo specie appartenenti al sistema di Tanaka. Esistono differenze sostanziali tra i due sistemi in merito alla classificazione dei mandarini. Questa è particolarmente rilevante, in quanto i mandarini e i mandarino-simili includono molti genotipi ampiamente coltivati e di grande importanza economica. Tutti i mandarini sono stati inclusi da Swingle nella specie *Citrus reticulata* ad eccezione di *C. tachibana* (specie selvatica del Giappone) e *C. indica* (specie selvatica dell'India), mentre Tanaka li separò in 36 specie (Nicolosi, 2007).

3.3 Cenni botanici

Dal punto di vista morfologico gli agrumi sono arbusti o alberi di medie dimensioni. Essi presentano un apparato radicale superficiale, tanto che la massima parte è contenuta nei primi 50 cm di terreno. Il fusto e le branche sono in genere lisci. Spine sono presenti nei rami e nelle brachette di quasi tutte le specie ed in maniera più accentuata del *Poncirus* e di alcuni cedri. Le foglie hanno dimensioni variabili. Le ali sono assenti, o minime, nel limone e nelle lime, mentre sono molto estese nei *Papeda*. In tutti gli agrumi, le foglie sono sempreverdi ed unilaminari, ad eccezione nel *Poncirus* e nei suoi ibridi (es. citrange Troyer e Carrizo), in cui sono caduche (o parzialmente caduche) e tricomposte. Le foglie sono provviste di oli essenziali. I fiori, generalmente ermafroditi, sono di colorazione violacea nel limone e in alcuni cedri, bianchi nelle altre specie. La struttura del fiore è pentamera. Ad ogni carpello corrisponde uno spicchio nel frutto. Nelle cultivar appartenenti al gruppo degli aranci "Navel" si ha la presenza di 2 o più verticilli di carpelli, che si evidenziano nel frutto con il tipico "ombelico". Il frutto è un esperidio, caratterizzato da spicchi tenuti uniti da un asse centrale. Il succo all'interno degli spicchi è racchiuso in vescicolette. Il frutto dell'agrumo a maturazione è esternamente colorato per la presenza di caroteni e, alle volte, di antociani nel flavedo, che include i cromatofori e le ghiandole oleifere. Tra epicarpo e mesocarpo non c'è netta separazione di colore, perché i cromatofori si insinuano anche nella parte esterna del mesocarpo. Procedendo dall'esterno verso l'interno, al flavedo segue l'albedo, che può essere più o meno spesso e si distingue per il colore bianco e per la consistenza spugnosa. All'albedo seguono gli spicchi, che aderiscono all'asse centrale o medula.

I semi in molte cultivar per il consumo fresco sono assenti e i frutti si formano per partenocarpia. La presenza di semi nei frutti è richiesta invece per i portinnesti. In molte specie e cultivar di agrumi, i semi sono poliembrionici, cioè, accanto all'embrione proveniente da fecondazione, ve

ne sono altri che hanno origine dal tessuto nucellare che avvolge il sacco embrionale. Questi embrioni detti apogamici o nucellari si originano per mitosi da cellule somatiche della pianta madre. Pertanto, le piantine provenienti dagli embrioni nucellari hanno lo stesso genotipo della pianta madre (AA.VV., 1991).

3.4 Esigenze pedoclimatiche

Gli agrumi vengono coltivati in zone climatiche estremamente variabili sia per condizioni di umidità che di temperatura. Il range di coltivazione è compreso tra il 40° parallelo Nord (Corsica e Giappone) e il 40° parallelo Sud (Nuova Zelanda), passando dai climi caldo-umidi equatoriali, a quelli caldi subtropicali fino ai climi marittimi più freschi. La sensibilità dell'albero e del frutto al gelo, variando sensibilmente tra le specie e i portinnesti, rappresenta uno dei maggiori fattori limitanti le regioni e le località dove gli agrumi possono essere coltivati con successo. A temperature di circa -2 °C si verifica l'aborto e la cascola dei frutti, piccioli e foglie muoiono anche dopo pochi minuti di esposizione a temperature comprese tra -7 e -3 °C (Rieger, 2002). Estati lunghe e sufficientemente calde sono richieste per consentire al frutto di crescere e di raggiungere la maturità. Ciò risulta essere un vincolo per le zone di coltivazione degli agrumi più fresche. Nelle regioni con clima mediterraneo, caratterizzate da lunghi periodi siccitosi estivi, l'irrigazione è indispensabile per favorire una crescita soddisfacente dell'albero e un adeguato sviluppo dei frutti. Sebbene gli agrumi crescano bene ai tropici, la maggioranza dell'agrumicoltura si pratica ad una latitudine compresa tra i 20 e i 40 °. Le principali difficoltà che si riscontrano sono lo sfasamento del ciclo produttivo e l'ottenimento di frutti di scarsa qualità. Nelle regioni tropicali ed equatoriali, caratterizzate da temperature ed umidità elevate tutto l'anno, gli alberi tendono spesso a fiorire scarsamente risultando quindi bassa la produttività. Se da un lato periodi ininterrotti di temperature elevate ai tropici migliorano la crescita e la maturazione dei frutti, diversi aspetti relativi alla qualità dei frutti possono venir meno. La qualità interna di cultivar di arance e mandarini per il consumo fresco può divenire inferiore per un più basso contenuto in acidi. Basse temperature sono necessarie per la pigmentazione della buccia nelle arance e nei mandarini, e tali frutti, ai tropici, non raggiungono in genere il colore desiderato. Inoltre, i frutti in tali zone di coltivazione presentano delle imperfezioni della buccia e sono più suscettibili agli attacchi parassitari che contribuiscono a deteriorare il loro aspetto (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

Gli agrumi si adattano ad un'ampia gamma di suoli: da quelli quasi puramente sabbiosi, a quelli organici a quelli argillosi pesanti (Rieger, 2002). Stesso discorso vale per il pH e la salinità. Non tollerano invece prolungate condizioni di ristagno idrico che possono provocare talvolta danni

anche irreversibili (Rieger, 2006). Sono sensibili agli eccessi di boro, di carbonato di sodio e al cloruro di sodio (Purseglove, 1968).

3.5 Proprietà nutritive degli agrumi

Il valore nutritivo e terapeutico degli agrumi è riconosciuto fin dai tempi antichi. Come già detto, i frutti di agrumi, forniscono un adeguato apporto di vitamina C. E' stato dimostrato che gli agrumi possiedono proprietà antiossidanti e antimutagene e hanno effetti positivi sul sistema osseo, cardiovascolare ed immunitario (Codoñer-Franch e Valls-Bellés, 2010). La vitamina C è un nutriente essenziale, solubile in acqua, che agisce da antiossidante ed è coinvolta nel metabolismo del ferro, nella biosintesi della carnitina, del collagene ed è un cofattore di vari processi enzimatici ed ormonali (Meister, 1994; Palacios, 2006; Otten *et al.*, 2006). Essa è anche coinvolta nel sistema immunitario, stimolando la funzione dei globuli bianchi (Wintergerst *et al.*, 2006). Oltre all'acido ascorbico, questi frutti contengono diversi composti fitochimici che svolgono il ruolo di nutraceutici, come i carotenoidi (licopene e β -carotene), limonoidi, flavononi (naringina e rutoside), vitamina B e altri nutrienti correlati come tiamina, riboflavina, acido nicotinico, acido pantotenico, piridossina, acido folico, biotina, colina e inositolo. I flavonoidi del succo degli agrumi, e, in particolare, quelli delle arance e dei pompelmi sono molto efficaci in quanto migliorano la circolazione sanguigna e posseggono proprietà antiallergiche, antitumorali ed antivirali (Filatova e Kolesnova, 1999).

Tra i componenti presenti negli agrumi, importante è il ruolo svolto dalle fibre. Le fibre, infatti, promuovono la sazietà, la defecazione e riducono l'assorbimento e/o il riassorbimento del glucosio, degli acidi grassi, del colesterolo e della bile, riducendo così il rischio di malattie cardiovascolari diminuendo il bisogno di assunzione di cibo e promuovendo una sana fermentazione intestinale (Brown *et al.*, 1999; Dikeman e Fahey, 2006). Le principali fibre contenute negli agrumi sono le pectine, che costituiscono il 65-70% del contenuto totale in fibre (Economos e Clay, 2012).

3.6 Diffusione ed importanza economica degli agrumi

Gli agrumi sono i frutti maggiormente prodotti al mondo, seguiti da uva, mele e banane, e sono coltivati in più di 80 paesi (Chang, 1992). La produzione mondiale degli agrumi nel 2012, secondo le stime della FAO, è stata pari a 131 mln di tonnellate (FAO, 2011). Nella graduatoria dei Paesi produttori, le prime posizioni sono occupate da Cina e Brasile, rispettivamente con 22,9 e 22,7 mln di tonnellate. Gli Stati Uniti che fino a qualche anno fa detenevano il secondo posto, subito dopo il Brasile, oggi sono scesi al terzo posto con 10,4 mln di tonnellate, seguiti dall'India

con 8,3 mln di tonnellate. Tra i Paesi del bacino del Mediterraneo, la Spagna risulta essere il maggiore produttore con 6,6 mln, seguita da Egitto ed Italia, rispettivamente con 3,6 e 3,2 mln di tonnellate. Il gruppo principale di agrumi coltivati è rappresentato dalle arance con il 61,2% della produzione agrumicola mondiale. Seguono i mandarini, i clementine e i tangerini che rappresentano il 22,1% della produzione totale di agrumi. Limoni e lime contribuiscono con l'11,2% del totale. Infine, da annoverare è il gruppo dei pompelmi, il cui impiego principale è per la produzione di succhi, che rappresentano oggi il 5,5% del valore economico complessivo. L'agrumicoltura italiana da qualche tempo ha ceduto la posizione di leadership nel mercato mondiale che manteneva fino agli anni '90 e tutt'oggi continua a perdere competitività (Perito *et al.*, 2007) nei confronti di quei paesi, come ad esempio la Spagna, che hanno via via manifestato una maggiore abilità nell'affrontare le sfide imposte dalla rapida globalizzazione dei mercati (Del Campo e Julia, 2002).

L'Italia, infatti, non si è mostrata dinamica nel mercato: la produzione di agrumi si è mantenuta pressochè costante nell'ultimo ventennio, il segmento del prodotto trasformato ha avuto un tasso di sviluppo contenuto e la penetrazione dei prodotti freschi e trasformati nei circuiti commerciali di maggior peso rimane tuttora piuttosto scarsa. Tale aspetto assume particolare rilievo in quanto condiziona la crescita del comparto in un'era in cui nei mercati, essendo sempre più globalizzati, la maggior parte dei prodotti alimentari vengono commercializzati attraverso la Grande Distribuzione Organizzata (GDO) e dove la logistica e la standardizzazione delle produzioni contribuiscono in buona parte a garantire un ritorno economico remunerativo sia ai produttori che ai trasformatori. Le difficoltà che si incontrano in fase di distribuzione da un lato, e le lacune strutturali ed organizzative della base produttiva dall'altro, penalizzano l'Italia sia sul fronte degli scambi internazionali che sul mercato interno. Le produzioni italiane, infatti, sebbene godano di un apprezzamento nel mercato per le spiccate caratteristiche organolettiche e di qualità intrinseche, faticano però ad affermarsi nei circuiti commerciali internazionali e risentono della forte concorrenza di paesi meglio organizzati a garantire prodotti con gli standard qualitativi ed i volumi richiesti, in particolare, dalla GDO. Ad esempio, la Spagna si è affermata come *competitor* nel mercato degli agrumi allo stato fresco, mentre gli USA ed il Brasile per i succhi ed i trasformati in genere (Inea, 2008).

A livello nazionale, com'è noto, le regioni del mezzogiorno contribuiscono in massima parte alla produzione agrumicola con 3,1 mln di tonnellate (Istat, 2012). La Sicilia risulta essere leader nella produzione di arance, mandarini e clementine e, in particolare, la provincia di Siracusa è la maggiore produttrice di limoni.

3.7 Caratteristiche dei principali portinnesti adoperati in agrumicoltura

1) Arancio amaro (*Citrus aurantium* L.)

L'arancio amaro, *C. aurantium*, è stato il principale portinnesto impiegato in agrumicoltura. È stato utilizzato estesamente negli Stati Uniti, nelle regioni del Mediterraneo, in Sud America, Cuba, in America Centrale e in misura limitata in Australia e Nuova Zelanda. L'arancio amaro è ancora impiegato nelle regioni del Bacino del Mediterraneo, ma il presentarsi del virus della tristeza in Spagna ed Israele, ha determinato l'uso di altri portinnesti tolleranti o resistenti. Ad oggi questo portinnesto è utilizzato limitatamente nei nuovi impianti solo nei paesi in cui il virus della tristeza non è presente. Per tale specie, numerosi sono i pregi da elencare: tollerante alla gommosi causata da *Phytophthora spp.*, altamente tollerante i suoli calcarei (Wutscher, 1979), tollerante alla Psorosi (CPsV), Xiloporosi (CCaVd) e Exocortite (CEVd), mediamente tollerante il freddo e il marciume secco. Inoltre induce ottime caratteristiche qualitative e risulta compatibile con molte cultivar. Presenta un apparato radicale fittonante, nei terreni sabbiosi, che si può dividere in due o tre grosse radici a sviluppo verticale e due palchi ad andamento orizzontali, mentre nei terreni argillosi lo sviluppo è più contenuto (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

2) Limone Volkameriano (*C. volkameriana* Ten. e Pasq.)

Citrus volkameriana, o “Volk”, come spesso è chiamato, è un ibrido di limone probabilmente originato dall'incrocio tra limone (*Citrus limon*) e arancio amaro (*Citrus aurantium*) che induce alla marza (o varietà) le stesse caratteristiche del limone rugoso, includendo la scarsa qualità dei frutti (dovuta ad un basso contenuto in solidi totali ed acidità) e la scarsa resistenza al gelo. È una pianta che presenta un vigore elevato, portamento assurgente con la presenza su branche e rami di spine di piccole dimensioni. Presenta foglie ellittiche con l'apice parzialmente arrotondato. I fiori sono di piccole dimensioni mentre i frutti presentano una forma da rotondeggiante ad ovale con la buccia di colore giallo aranciato. Presenza di numerosi semi all'interno del frutto che sono mediamente poliembrionici. In merito alle caratteristiche produttive, *C. volkameriana* presenta una fruttificazione costante, un'elevata produttività ed una media persistenza del frutto maturo sulla pianta. Non è suscettibile al CTV, CEVd e CCav (cachexia) ma è suscettibile ai danni causati dai nematodi. In studi condotti a lungo termine, il limone Volkameriano si è distinto per la sua spiccata precocità di entrata in produzione, per i

frutti di elevata pezzatura e le rese più elevate rispetto a molti altri portinnesti. La suscettibilità alla ruggine ha causato notevoli perdite per tale specie, tanto che ha destato un certo interesse la sua piantumazione solo per l'ottenimento di frutti da destinare alla produzione di succhi (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

3) **Alemow** (*Citrus macrophylla* Wester)

Macrophylla, o “Mac”, come spesso è chiamato, è un genotipo originario delle Filippine che presumibilmente deriva dall'ibridazione tra *C. celebica* e *C. grandis*. La maggior parte degli agrumi, in particolare limoni e lime, sono abbastanza vigorosi e produttivi quando sono innestati su Alemow. Come per altri tipi di limone, la qualità dei frutti di arance e mandarini è piuttosto scarsa se innestati su tale portinnesto. In genere il succo presenta un basso contenuto in zuccheri ed acidi comparati con quello di altri portinnesti come ad esempio l'arancio amaro. E' estremamente sensibile al freddo, al mal secco e alla tristezza, ma è resistente al calcare attivo (anche > 14%). In Italia è stato usato per le clementine e per il tangelo Nova, di cui aumenta la produttività e la pezzatura, anche se l'accumulo di solidi solubili totali è inferiore a quello ottenibile con altri portinnesti (citrange, arancio amaro). I frutti di Nova provenienti da piante innestate su questo soggetto tendono a granulare maggiormente. In Italia può essere interessante come portinnesto del limone nei terreni calcarei, anche se richiede l'utilizzo di marze libere da viroidi per la sua sensibilità alla cachessia-xiloporosi (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

4) **Citrumeli** (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.)

La maggior parte degli incroci intergenerici che hanno prodotto molti citrumeli furono effettuati da W. T. Swingle nel 1907. Uno di questi incroci, il citrumelo Swingle, che è stato rilasciato nel 1974 ed identificato con la sigla CPB 4475, è senz'altro quello che maggiormente si sta affermando nella nostra agrumicoltura. E' un portinnesto che possiede molte caratteristiche di tolleranza agli stress biotici ed abiotici, tanto che nel titolo di una delle prime pubblicazioni veniva definito: 'Swingle citrumelo: an ultraresistant rootstock' (Wutscher, 1974). Il citrumelo Swingle è resistente al freddo ed in più, grazie alla sua vigoria, induce una veloce ricostituzione delle parti della chioma disseccate; è inoltre resistente alla tristezza, alla gommosi causata da *Phytophthora spp.*, ai nematodi. E' anche meno sensibile all'exocortite dell'arancio trifogliato e dei citrange. Per quanto riguarda la compatibilità con le varietà innestate è risultato disaffine solo con gli aranci Pera e Roble e con il mandarino Murcott. E' tollerante alla siccità e risulta

altamente poliembrionico. Il suo uso è comunque limitato a causa della sua accentuata sensibilità alla salinità e ai ristagni idrici. Inoltre, non tollera sia i suoli argillosi che il pH alcalino ed è estremamente sensibile al calcare attivo. Questa sensibilità è stata osservata anche molti anni dopo l'impianto. In prove effettuate ad esempio per il Navelina ISA 315, dopo dieci anni dall'impianto, si sono verificati i primi sintomi di carenza di ferro. Sulla base di tale esperienza la soglia di calcare attivo di 2,5% può essere ritenuta solo indicativa, in quanto probabilmente esistono anche altre concause che contribuiscono ad esaltarne la sensibilità (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

5) **Arancio trifogliato (*Poncirus trifoliata* [L.]Raf.)**

In passato, l'arancio trifogliato non è stato molto utilizzato come portinnesto in quanto inadatto ai terreni sabbiosi profondi, a causa del suo limitato sviluppo dell'apparato radicale. L'ampia diffusione del sistema di irrigazione a microportata d'erogazione ha ovviato a tale problema. Appartiene al genere *Poncirus* ed è l'unico portinnesto a foglia caduca. Induce un'elevata tolleranza al freddo. E' stato utilizzato nei lavori di ibridazione con il genere *Citrus* per ottenere individui resistenti al freddo. Trasferisce anche alla sua progenie in notevole misura la resistenza alla tristezza, legata ad un singolo gene (Gmitter *et al.*, 1996). Esistono selezioni a fiori grandi ed a fiori piccoli; le selezioni a fiore piccolo inducono una maggiore riduzione dello sviluppo della chioma. Si adatta bene nei terreni che non hanno un contenuto in calcare attivo superiore al 4%. Tollerante alle *Phytophthorae spp.*, ma molto sensibile all'exocortite. Le varietà di arancio, clementine e mandarino innestate su questo portinnesto producono frutti con caratteristiche qualitative elevate. Induce inoltre un'ottima pigmentazione antocianica nella buccia e nella polpa dei frutti di Tarocco. La selezione Flying dragon [*P. trifoliata* var. *monstruosa* (T. Ito) Swing.], caratterizzata da un habitus di crescita contenuto e rami e spine contorti, è stata presa in considerazione per l'utilizzo negli impianti ad alta densità, dal momento che riduce lo sviluppo della pianta bimembre del 75% rispetto ad un portinnesto standard (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

6) **Citrango (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.)**

I citrango sono degli ibridi che derivano dall'incrocio intergenerico tra arancio dolce e arancio trifogliato. Tali ibridi sono stati ottenuti da Swingle nel 1909, in Florida, con l'obiettivo di ottenere dei genotipi resistenti al freddo, in quanto disastrose gelate avevano colpito quello stato

alla fine del XIX secolo. Produce frutti con elevato contenuto in ponciridina, pertanto, non sono commestibili. Eccellenti risultati, dopo tanti anni di sperimentazione, sono stati ottenuti in termini di produttività e qualità dei frutti, se adoperati come portinnesti. Similmente all'arancio trifogliato hanno foglie trifogliate (raramente unifogliate), ma, a differenza di questo, sono parzialmente caduche. Contrariamente al genitore hanno dimostrato di tollerare i terreni calcarei, con calcare attivo non superiore al 13%.

Le piante dei due ibridi, Carrizo e Troyer, sono simili. Il Carrizo è stato selezionato in Texas da una popolazione di Troyer, per la maggiore resistenza al nematode *Radopholus similis*. I citrange tollerano gli attacchi di *Phytophthora spp.*, mentre sono sensibili agli attacchi di *Fusarium spp.*.

Allo stato attuale i citrange, ed in particolare i citrange Troyer e Carrizo, sono fra i portinnesti più diffusi nelle principali aree agrumicole del mondo, non solo per le caratteristiche produttive e qualitative che conferiscono alle cultivar innestate su di essi, ma soprattutto per la tolleranza al virus della Tristezza. Ad esempio, prove effettuate dal CRA-ACM (Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee) di Acireale, hanno dimostrato che i citrange inducono una qualità superiore rispetto all'arancio amaro. Nelle cultivar pigmentate, i citrange inducono una colorazione antocianina intensa. Le cultivar di Tarocco innestate su questi soggetti producono frutti con la buccia più fine, che presentano inoltre una migliore consistenza, risultano più dolci e colorati in rosso per un maggiore accumulo di antocianina. Inoltre è stato constatato che i citrange, rispetto all'arancio amaro, inducono nelle foglie livelli più elevati di Mg. La sensibilità nei riguardi dell'exocortice comporta la necessità di utilizzare materiale di innesto esente dal viroide. Le piante infette sono stentate nella crescita e nella corteccia del soggetto si può osservare la tipica desquamazione (*scaling*) (Russo e Reforgiato Recupero, 2009).

Nel 1987 è stato rilasciato dall'Università della California un citrange denominato C-35 (Cameron e Soost, 1986), il quale differisce dal Troyer e dal Carrizo per uno sviluppo più contenuto della chioma, per la resistenza al *Tylenchulus semipenetrans* (nematode delle radici) e per una maggiore sensibilità alla clorosi ferrica (Forner-Giner *et al.*, (2003).

7) **Mandarino Cleopatra** (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.)

Originario dell'India, forma piante a portamento compatto e arrotondato. Le foglie sono piccole, strette e di colore verde scuro. I fiori sono piccoli e bianchi e i frutti, globosi e depressi ai poli, sono simili alle clementine. La buccia è di colore arancio, poco aderente alla polpa, che è morbida e succosa dal sapore un po' acido. La polpa presenta numerosi semi piccoli e poliembrionici. Conferisce carattere di rusticità ed in particolare di resistenza al freddo, paragonabile a quella dell'arancio amaro. Si adatta ad una vasta gamma di suoli specialmente

quelli calcarei e con pH elevato. Tale portinnesto è molto suscettibile al marciume radicale sebbene sia tollerante il CTV, il CEVd e CCav. Altra caratteristica di pregio è la compatibilità che ha con molte cultivar con cui produce frutti di elevata qualità.

C. reshni è considerato un importante portinnesto negli Stati Uniti ed in altri paesi agrumicoli. Viene utilizzato anche come pianta ornamentale per la lunga persistenza dei frutti all'albero.

8) **Limone rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.)**

Il limone rugoso raggiunge i 3-6 m di altezza e di solito presenta spine sui rami.

Le foglie sono alterne, di colore rosso quando sono giovani, che diventano poi verde scuro nella pagina superiore e verde chiaro in quella inferiore. La loro forma può variare da oblunghie, ellittiche od ovali, finemente dentate con sottili piccioli alati. I fiori, leggermente profumati, possono essere solitari o possono essere riuniti in 2 o più mazzetti all'ascella delle foglie. Le gemme sono rossastre. I fiori aperti sono di colore bianco sulla superficie superiore (interna), violaceo nell'inferiore. Il frutto è ovale con una protuberanza a forma di capezzolo all'apice. La buccia è ruvida e di colore giallo, aromatica, punteggiata di ghiandole oleifere. La polpa è di colore giallo pallido, suddivisa in 8 - 10 segmenti, succosa ed acida. I frutti hanno pochi semi, ellittici od ovali, appuntiti, lisci, bianco all'interno. Il limone rugoso è ampiamente propagato per via gamica (Morton, 1987). Il limone rugoso ha attirato l'attenzione degli agrumicoltori come possibile portinnesto in quanto favorisce una rapida crescita delle piante e una precoce entrata in produzione per i limoni e per le arance innestati su di esso. E' tollerante il CTV e CEVd. Di contro, è un portinnesto molto vigoroso, sensibile alle basse temperature, ai nematodi e all'asfissia radicale. Non si adatta ai terreni asfittici, calcarei e teme il mal secco e il marciume radicale.

9) **Rangpur (*Citrus x limonia* Osbeck)**

Ibrido derivante probabilmente dall'incrocio tra *Citrus limon* e *Citrus reticulata*. Pianta originaria dell'India è utilizzata specialmente in Sud America come portinnesto. Albero di medie dimensioni, con ampi rami, leggermente penduli, con qualche spina. Le foglie, verde opaco, sono da ellittiche a ovate e hanno piccioli con alette. Produce fiori profumati con riflessi violacei, I frutti sono globosi o depressi; la buccia è sottile, arancione con sfumature giallastre o rossastre; la polpa è arancione con molti semi. Questo ibrido non è una lima vera e propria, come è indicato dal suo nome scientifico, ma è usato come sostituto della lima in alcuni paesi. In

combinazione con alcune varietà, conferisce alle piante caratteristiche simili a quelle della lima dolce. E' uno dei maggiori portinnesti adoperati in Brasile in quanto è tollerante il CTV e la siccità. Inoltre, risulta tollerare un'elevata salinità dei terreni. Le piante innestate su Rangpur sono suscettibili agli attacchi di nematodi e al freddo.

3.8 La propagazione degli agrumi

Il degrado sanitario dell'agrumicoltura, l'esigenza di limitare i danni causati da agenti patogeni trasmessi attraverso il materiale di propagazione e l'urgenza di migliorare lo standard qualitativo delle produzioni sono stati tali da giustificare una serie d'interventi miranti a migliorare lo stato sanitario minimo richiesto per la commercializzazione delle produzioni vivaistiche (D'Onghia *et al.*, 2001). Una serie di direttive Comunitarie sono state recepite con il D.M. del 14/04/1997, con cui si è introdotto una nuova categoria di materiale di propagazione, quella CAC (Conformità Agricola Comunitaria). Per l'ottenimento del materiale CAC, il decreto ha stabilito delle norme ben precise riguardanti le caratteristiche del materiale di moltiplicazione (requisiti fitosanitari ed identità varietale), i punti critici del processo produttivo in vivaio e della produzione del materiale di moltiplicazione, i requisiti di commercializzazione, gli obblighi del fornitore, ecc. Pertanto, uno dei requisiti fondamentali su cui ha posto l'attenzione il comparto agrumicolo negli ultimi è stato l'ottenimento di piante certificate dal punto di vista genetico e sanitario. E' stato, pertanto, opportuno ricorrere a nuove metodiche rivolte sia a limitare i tempi di produzione che il miglioramento della qualità del materiale vivaistico.

Il comune portinnesto arancio amaro è stato ormai sostituito da tempo dai citrange, molto più delicati nelle fasi di allevamento in vivaio e di difficile reperibilità per quanto concerne il seme certificato (Mennone e Vitelli, 2006). In passato, i portinnesti venivano prodotti in semenzaio realizzati in cassoni di legno disposti in strutture protette e coperti con film plastici. Il trapianto avveniva a radice nuda e pertanto risultava spesso traumatico poichè le piantine erano soggette ad infezioni parassitarie a causa delle ferite provocate sull'apparato radicale durante l'operazione di "strappo" dal semenzale. La tecnica di propagazione attraverso l'uso dei contenitori alveolati per la produzione di piantine con pane di terra ha ridotto notevolmente lo stress da trapianto. Allo stato attuale due sono le tecniche adoperate: la semina "non forzata" e quella "con forzatura". La prima avviene in contenitori alveolati in PVC (40 fori) e realizzata nel mese di aprile. Gli alveoli vengono posti in ambiente protetto (serre-tunnel non riscaldate) coperto con teli in polietilene. Il substrato è in genere un terriccio costituito da una miscela di sabbia (disinfettata e disinfestata), torba e pietra pomice a tessitura grossolana, a pH sub-acido (6,6-6,8),

a densità leggera, soffice e ben drenato che assicura una germinazione uniforme dei semi. Con una temperatura del terreno di circa 20°C, la germinazione avviene in 30-40 giorni. La semina “con forzatura” è anticipata invece al mese di febbraio ed avviene in contenitori alveolati (84 fori) in cubetto pressato, molto simili a quelli adoperati nel vivaismo orticolo. L’allevamento avviene in una struttura dotata di impianto di riscaldamento basale e di termoventilazione che assicura una temperatura di circa 18°C. Il substrato adoperato è una miscela di torba bruna e bionda con presenza di materiali inerti, fertilizzanti ed un pH intorno a valori di 6,5. Il seme viene dunque inserito nel cubetto pressato e ricoperto con vermiculite. Il tempo di germinazione, con tale tecnica, si riduce a 20 giorni. Con il primo metodo la fase di trapianto avviene dopo quasi 1 anno dalla semina, mentre con il secondo occorrono solo 2 mesi. Occorre un anno per entrambe le tipologie di portinnesti, per poter essere innestati. Il trapianto avviene in contenitori neri della capacità di 4-6 litri, ed il substrato adoperato è lo stesso di quello utilizzato per i semenzai non forzati. Questi contenitori vengono posti in ambiente protetto ricoperto con teli in polietilene. Per ridurre lo stress da trapianto, le piantine vengono preventivamente immerse in una soluzione a base di ife fungine di specie micorriziche. L’innesto degli agrumi viene realizzato a gemma dormiente, durante il periodo autunnale (settembre-ottobre), oppure a marza durante la ripresa primaverile (fine-febbraio-giugno). L’innesto viene condizionato con sacchetti di plastica al fine di trattenere l’umidità, protetti a loro volta con un sacchetto di carta per evitare l’esposizione diretta alla luce. Dopo circa 20 giorni, comincia il germogliamento delle piante innestate e, a quel punto, è possibile rimuovere il sacchetto di plastica e mantenere solo quello di carta su cui vengono praticate delle fessure longitudinali. Interventi cesori prossimi all’innesto vengono eseguiti sui portinnesti allo scopo di eliminare i germogli superflui, spine e getti del tronco. In genere, per proteggere le piantine dall’insolazione e dalle escursioni termiche, il tronco viene rivestito con un tubolare di plastica morbida. In piantonaio, cimature durante lo sviluppo vegetativo del nesto vengono praticate per favorire l’arieggiamento e la penetrazione della luce tra le file e l’irrobustimento dell’impalcatura delle piantine. I piantoni sono solitamente dotati di due sistemi di irrigazione: quello sottochioma a basso volume, con gocciolatori localizzati per singola pianta della portata di 1 l/h, con i quali viene somministrata acqua, elementi nutritivi, ecc.; e quello soprachioma, adoperato per somministrare acqua nebulizzata ad elevatissima pressione (fog-system), per abbassare la temperatura all’interno della serra e mantenere elevata l’umidità ed eseguire eventuali concimazioni fogliari. La qualità dell’acqua irrigua viene periodicamente monitorata per il controllo delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche. Particolare attenzione è posta in merito al controllo delle malerbe e l’adozione di adeguati metodi di difesa durante tutto il ciclo di produzione degli agrumi. In semenzaio il

controllo delle malerbe è effettuato manualmente, mentre in piantonaio, quando il fusticino è ben lignificato, si ricorre al diserbo chimico. In genere vengono adoperati miscele di erbicidi di contatto come il glufosinate-ammonio e prodotti come il Pendimethalin e l'Oxifluorfen che inibiscono la germinazione e lo sviluppo delle infestanti. In serra, per ridurre notevolmente lo sviluppo delle infestanti, si ricorre alla pacciamatura con appositi teli di plastica e/o con un sottile strato di ghiaia. La lotta chimica viene eseguita per prevenire gli attacchi della minatrice serpentina degli agrumi (*Phyllocnistis citrella*), del raghetto rosso (*Tetranychus urticae*) e delle *Phytophthora spp.*, agenti causale del marciume radicale. Gli antiparassitari vengono somministrati mediante irrorazioni sopra chioma o localizzati alle radici con l'acqua di irrigazione (Mennone e Vitelli, 2006).

3.9 Innovazioni tecnologiche e sviluppo del vivaismo agrumicolo

Il settore vivaistico è senz'altro alla base della moderna agrumicoltura e la sua prerogativa fondamentale è quella di migliorare la competitività attraverso una razionale impostazione degli impianti, attraverso la scelta di zone ad alta vocazionalità da un lato, e l'utilizzo di materiale vivaistico geneticamente e sanitariamente certificato dall'altro (Sansavini *et al.*, 2006). Con l'avvento di alcune malattie che hanno distrutto importanti impianti di varie specie da frutto, i vivaisti hanno dovuto dare un importante contributo nella difesa dell'ambiente agricolo attraverso la produzione e diffusione di materiale garantito sotto il profilo sanitario (Catalano, 2003). La malattia che sta interessando ampie zone di coltivazione degli agrumi nel nostro paese è la tristezza degli agrumi (CTV). Pertanto, in virtù di questo, anche l'atteggiamento ed i rapporti tra vivaisti e produttori è cambiato negli ultimi anni. I produttori, infatti, oltre alla fornitura delle piante sono molto più esigenti nel conoscere in fase di preimpianto le caratteristiche delle cultivar e dei portinnesti che acquistano, in virtù dei contesti pedoclimatici su cui si andrà ad operare e alle cure agronomiche da eseguire nel frutteto dopo l'impianto. Il vivaismo frutticolo italiano nasce alla fine dell'800 e dapprima si è sviluppato nelle regioni del nord come Emilia-Romagna, Veneto e Trentino Alto Adige, interessando la coltura del melo, del pero e delle drupacee in genere. In seguito si è diffuso nelle regioni meridionali (Sicilia, Calabria e Puglia), con la coltura dell'olivo e degli agrumi. Sono sorte realtà vivaistiche all'avanguardia in termini di qualità del prodotto finito e professionalità che furono prese come modello per la nascita di futuri vivai frutticoli. Negli anni sessanta, con l'introduzione di nuove varietà provenienti dall'estero e di nuove tecniche di propagazione (coltura *in vitro*), i vivaisti cominciarono ad investire nella ricerca e nello sviluppo tecnologico della propria azienda per poter concorrere con

i *competitor* internazionali, soprattutto olandesi e francesi. A partire da quel momento, aumenta sempre di più l'esigenza di offrire ai produttori dei servizi "aggiuntivi", rispetto alla ordinaria fornitura delle piante. Questo *surplus* è rappresentato dalla garanzia della qualità delle produzioni. Con l'entrata in vigore nel 1981 della legge provinciale che regola la produzione vivaistica, è stato dato inizio alla certificazione obbligatoria dei fruttiferi, la prima sul territorio nazionale (Stainer, 2007). Tale esigenza, di essere tutelati dal punto di vista legislativo, nasce in alcune regioni del nord Italia come Trentino ed Emilia Romagna, con lo scopo di qualificare le produzioni locali attraverso programmi di certificazione genetico-sanitaria delle produzioni realizzate *in loco*. Nascono in quel periodo le prime aggregazioni vivaistiche sottoforma di consorzi ed associazioni, come ad esempio: il CAV (Centro Attività Vivaistiche di Faenza (RA) per l'Emilia-Romagna, il KSB (Consorzio Vivaisti Altoatesini) per la provincia di Bolzano, il COVIFT (Consorzio dei Vivaisti Frutticoli Trentini) per la provincia di Trento e il COVIP (Consorzio Vivaistico Pugliese). L'obiettivo di questi organismi era quello di qualificare le produzioni vivaistiche dei propri soci attraverso la partecipazione a programmi di certificazione genetico-sanitaria, coordinati dai rispettivi servizi fitosanitari ed enti locali di competenza. Nel 2007, è stata emanata la legge in merito alla certificazione su base volontaria dei fruttiferi che sostituiva la sopracitata legge provinciale e quelle emanate da altre regioni. Tale normativa, avendo effetto a livello nazionale, ha avuto ripercussioni positive sulla qualità delle piante, in quanto era a discrezione di ogni singolo frutticoltore garantirsi il materiale controllato e garantito dal punto di vista genetico e sanitario. Le nuove tecniche adoperate nell'odierno vivaismo frutticolo si basano sul giusto compromesso tra impegno temporale e tecnico per l'ottenimento di un elevato livello qualitativo delle piante. Negli ultimi anni si è puntato a ridurre sempre di più il tempo di ottenimento degli astoni pronti per la commercializzazione. I benefici ottenuti hanno riguardato, oltre la precocità di produzione, la riduzione degli interventi di potatura in fase di allevamento ed un maggior controllo sul vigore e crescita degli alberi, con minore sviluppo in altezza. Un vantaggio di indubbia importanza, di derivazione dal vivaismo ornamentale (Frangi *et al.*, 2006), è la possibilità di coltivare gli agrumi in contenitore. L'allevamento in contenitore ha consentito un miglioramento, per il vivaista, dell'organizzazione nelle fasi di produzione, di stoccaggio e spedizione, e la riduzione dei tempi di produzione delle piante; per il frutticoltore, la possibilità di dilazionare il periodo di piantagione e di piantare anche dopo l'inizio dell'attività vegetativa, riducendo i rischi di post-trapianto.

Per ultimo, ma non per ordine d'importanza è la meccanizzazione dei cicli produttivi. La necessità per i vivaisti di ridurre i costi di produzione, ha favorito un miglioramento delle operazioni colturali in vivaio, le quali possono essere facilmente coordinate e migliorate

attraverso l'uso di attrezzature specifiche o polivalenti (Ade e Musacchi, 2003). La scelta di meccanizzare tutti o quasi tutti i processi produttivi è economicamente giustificabile a seconda delle dimensioni dell'azienda vivaistica.

3.10 Evoluzione e prospettive dei portinnesti adoperati in agrumicoltura

Fino a qualche anno fa, il virus della tristezza degli agrumi era presente in Sicilia in forma sporadica (Caruso *et al.*, 2003). Alla luce di questa grave emergenza fitosanitaria, ben poco si è fatto in Italia per modernizzare le aziende agrumicole esistenti, alcune delle quali si affidano tutt'ora all'uso dell'arancio amaro come portinnesto. I motivi della perdurante fiducia riposta in tale portinnesto sono da ricondurre da un lato alle caratteristiche di pregio da esso posseduto che solo in parte si riscontrano in altri soggetti (tolleranza al freddo ed ai terreni alcalini, capacità di indurre buone caratteristiche qualitative), dall'altro, al fatto che i programmi di miglioramento genetico necessitano di tempi molto lunghi (diversi anni) per validare nuovi portinnesti nei diversi ambienti pedoclimatici e con le diverse cultivar (Reforgiato Recupero e Continella, 2006). In base alla gravità della malattia nei paesi agrumicoli in cui il virus ha fatto la sua comparsa, le aree di coltivazione degli agrumi sono state suddivise in tre tipologie:

1. *Aree comunemente contaminate* (Brasile, Sudafrica, Australia, ecc.), in cui il virus è endemico. In tali zone viene eseguita la pre-immunizzazione, ovvero l'inoculazione di combinazioni tolleranti con ceppi deboli del virus, al fine di aumentare il grado di tolleranza. Sebbene tale tecnica abbia dato risultati positivi per diverse combinazioni d'innesto, scarsi risultati sono stati ottenuti adoperando l'arancio amaro come portinnesto (Müller *et al.*, 1984; Müller e Costa, 1977; Passos *et al.*, 1992)
2. *Aree mediamente contaminate* (California, Spagna, Florida), in cui l'uso di portinnesti tolleranti offre un buon controllo del virus, probabilmente per l'assenza del ceppo virulento o del vettore efficiente (*Toxoptera citricidus*). In tali aree viene tuttora impiegato l'arancio amaro come portinnesto ma in percentuali più o meno ridotte.
3. *Aree non ancora o solo di recente contaminate* (Marocco, Italia, Texas), in cui l'arancio amaro è ancora il portinnesto più impiegato. La sua sostituzione è stata limitata solo in quei casi in cui la malattia si è manifestata in maniera puntiforme.

I portinnesti che vengono adoperati in sostituzione dell'arancio nei paesi agrumicoli sono prevalentemente i citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Sebbene questi ibridi (Carrizo, Troyer e C35) siano tolleranti il virus della tristezza, presentano alcuni inconvenienti come la sensibilità

alla salinità dei terreni e agli attacchi di *Fusarium* spp. Oltre ai citrange, da annoverare come portinnesti adoperati e tolleranti il CTV, sono: il limone volkameriano (*C. volkameriana*), il mandarino Cleopatra (*C. reshni*), il citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) e la lima di Rangpur (*C. limonia*). In Italia, sono state condotte diverse esperienze in merito all'uso di portinnesti alternativi all'arancio amaro (Continella e La Rosa, 1986; Crescimanno *et al.*, 1986; Deidda e Frau, 1986; Reforgiato Recupero e Russo, 1988; Reforgiato Recupero *et al.*, 1992; Reforgiato Recupero e Tribulato, 2000), e da tali lavori è scaturito che i citrange (Carrizo in particolare) sono quelli maggiormente preferibili in quanto, rispetto agli altri portinnesti sopra citati, danno minor problemi in merito all'adattabilità alle diverse realtà pedoclimatiche agrumicole, e le produzioni sono paragonabili e talvolta anche superiori a quelle ottenute con l'arancio amaro. Negli ultimi anni si sta cercando di puntare alla costituzione di nuovi ibridi al fine ampliare il panorama di soggetti da poter utilizzare a seconda delle diverse aree di coltivazione. L'inconveniente è che, allo stato attuale, il numero di portinnesti è estremamente limitato e nei programmi di miglioramento genetico la validazione di nuovi soggetti richiede tempi molto lunghi. Recentemente sono stati provati con risultati incoraggianti degli incroci tra il genotipo monoembrionico *C. latipes*, usato come parentale femminile e arancio trifoliato [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], arancio amaro (*Citrus aurantium* L.) e limone volkameriano (*C. volkameriana* Pasq.) come parentali maschili (Reforgiato Recupero *et al.*, 2009).

4. Il gelso

4.1 Inquadramento tassonomico e botanica

Il gelso appartiene al genere *Morus* afferente alla famiglia delle *Moraceae*, che comprende molte specie. Esso è originario della regione Indo-Cinese ed è ampiamente distribuito nella bassa regione sub-himalayana fino a un'altitudine di 2100 m s.l.m., coprendendo sia le regioni temperate che sub-tropicali dell'emisfero settentrionale. Molte specie di questo genere sono utilizzate a livello commerciale per la produzione della seta e il fogliame rappresenta la fonte di cibo principale per i bachi da seta. Tra queste specie, *Morus alba* e *Morus nigra* producono frutti commestibili e sono le specie importanti per la sericoltura (Kamareddi, 2008). Le foglie di *Morus alba* hanno proprietà antiossidanti per la presenza di α -tocoferolo e β -carotene (Yen *et al.*, 1996). Attività ipoglicemizzante delle foglie è stata riscontrata in *Morus indica* (Kelkar *et al.*, 1996).

Il gelso è una pianta arborea dotata di notevole rusticità che ben si adatta a condizioni pedoclimatiche assai varie. L'areale di diffusione riguarda le zone temperate e tropicali ed in particolare il gelso è diffuso in tutto il bacino del Mediterraneo. In considerazione della sua grande adattabilità pedoclimatica, la coltura vegeta in un'ampia zona geografica denominata cintura serica mondiale, compresa tra il 50° parallelo N ed il 35° parallelo S. Molto simili, tanto da venir spesso confusi, il gelso bianco e il gelso nero hanno due storie nettamente separate: il primo è originario della Cina ed era coltivato nell'antichità in tutta l'Asia occidentale come nutrimento del baco da seta. Il gelso nero, invece, è da sempre considerato come albero da frutto, legato alle tradizioni della cucina mediterranea. In comune col primo ha il luogo d'origine, ossia l'Oriente, più precisamente il Caucaso, l'Armenia e la Persia, dove è ancora oggi una pianta spontanea. Si trova, anche se sempre più raramente, vicino ai casolari di campagna, nelle zone collinari e di pianura e lungo i bordi dei campi. Prima dell'introduzione del gelso bianco, anche il gelso nero veniva utilizzato come alimento del baco da seta, tuttavia le sue foglie hanno sempre costituito un nutrimento piuttosto scadente per i bachi. Rispetto al *M. alba*, il *M. nigra* è più robusto e più rustico, con chioma più densa e corteccia più scura e screpolata; le foglie sono piuttosto grandi, alterne, ovali, col margine irregolarmente dentellato e a volte lobato; il colore è verde scuro nella pagina superiore, più chiaro in quella inferiore che è anche "vellutata" al tatto. Le foglie del gelso bianco sono molto simili, soltanto un po' più piccole e di color verde tenero. Il frutto (mora) che ha la forma di un lampone allungato ed è provvisto di un breve peduncolo, è un'infruttescenza (sorosio) formata dagli involucri florali divenuti carnosì, ossia da un insieme di piccole drupe. E' viola-nerastro, lucido, più grosso e succoso e dal sapore dolce acidulo nel gelso

nero, bianco-verdognolo o rossastro e dal sapore più dolce nel gelso bianco. La propagazione del gelso avviene, in gran parte, per talea o per innesto. Purtroppo, poiché alcune cultivar presentano difficoltà nella radicazione, non sempre questi metodi possono essere applicati (Rai *et al.*, 2009). Per tale motivo, la tecnologia dell'incapsulamento potrebbe essere un valido strumento, in termini di efficienza e redditività, per la propagazione clonale in tempi rapidi (Kavyashree *et al.*, 2006). Nel caso del gelso le ricerche relative all'incapsulamento di propaguli unipolari (microtalee) sono ancora limitate (Bapat *et al.*, 1987; Pattnaik e Chand, 2000; Chiancone *et al.*, 2009).

4.2 Stato dell'arte della micropropagazione del gelso

Tra i metodi biotecnologici, la micropropagazione può essere di aiuto per risolvere alcuni problemi della propagazione del gelso su larga scala, impedita dalla bassa efficienza di radicazione (Bhau e Wakhulu, 2001). Il primo lavoro sulla coltura *in vitro* di gelso è stato riportato da Ohyama (1970), negli anni successivi la micropropagazione del gelso, soprattutto attraverso la proliferazione di gemme ascellari, è stata molto studiata (Ghugale *et al.*, 1971; Oka e Ohyama, 1974, 1975, 1981; Patel *et al.*, 1983; Mhatre, 1985; Ivanicka, 1987; Jain *et al.*, 1990; Sharma e Thorpe, 1990; Yadav *et al.*, 1990; Hossain *et al.*, 1992; Katase, 1993; Pattnaik *et al.*, 1996; Pattnaik e Cland, 1997; Vijaya Chitra e Padmaja, 1999, 2002, 2005; Tewary *et al.*, 2000; Wakhulu e Bhau, 2000; Lu, 2002; Bhau e Wakhulu, 2003). La rigenerazione di germogli da callo, non è ben documentata in tutte le specie di *Morus*. Gli unici lavori che mostrano rigenerazione da callo, sono limitati al *Morus alba* (Narayan *et al.*, 1989; Kathiravan *et al.*, 1995; Vijayan *et al.*, 1998; Bhau e Wakhulu, 2001), al *Morus bombycis* (Jain e Datta, 1992) e al *Morus indica* (cultivar "S13") (Sahoo *et al.*, 1997).

La tecnologia del seme sintetico è stata scarsamente applicata alla propagazione del gelso. In particolare, ricerche relative all'incapsulamento di propaguli unipolari sono riportate da Bapat *et al.*, (1987) e Pattnaik e Chand (2000). Per l'ottenimento di aploidi è stata applicata la coltura di antere, ma senza successo (Sethi *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1996), mentre è stato possibile rigenerare aploidi ginogenetici mediante la coltura *in vitro* di ovari (Lakshmi Sita *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1999).

SECONDA PARTE

1. Introduzione

Il progetto di ricerca svolto durante il dottorato ha riguardato principalmente l'applicazione della coltura *in vitro* per la propagazione di due importanti portinnesti di agrumi, il citrange Carrizo e il C35, tolleranti il virus della Tristezza degli agrumi (CTV), una grave malattia presente in tutti i paesi agrumicoli del mondo. La scarsità di piante madri di tali portinnesti per la produzione di semi comporta la necessità di importare semi o piante dall'estero (Starrantino e Caruso, 1988). Pertanto, la micropropagazione può ovviare a tale problema, poichè offre vantaggi come la rapidità di ottenimento di un gran numero di piante, la possibilità di produrre piante sane, uniformi ed identiche alla pianta di partenza, selezionata per le caratteristiche di pregio. Un importante strumento che potrebbe essere adoperato a supporto del vivaismo per la propagazione massale di tali portinnesti è il seme sintetico. In alcune specie come ad esempio negli agrumi, è stata osservata una scarsa conversione dei semi sintetici realizzati a partire da propaguli vitro-derivati unipolari; essa è attribuibile ad una serie di fattori (genotipo, formulazioni nutritive inadeguate dell'endosperma artificiale od del mezzo di semina, procedure inefficaci per indurre la radicazione nelle microtalee), e ne ha limitato fortemente l'utilizzo pratico.

Durante il primo anno di dottorato, pertanto, la ricerca è stata focalizzata dapprima nell'individuazione di un protocollo per la radicazione *in vitro* di microtalee di 1 cm di lunghezza di citrange Carrizo. In seguito, il mezzo di coltura che ha dato la percentuale di radicazione più alta, è stato utilizzato per la composizione dell'endosperma in una successiva prova di incapsulamento. Successivamente, è stato effettuato un esperimento per la valutazione della conversione di microtalee incapsulate di un genotipo siciliano di gelso nero (*Morus nigra* L.), denominato "Fontanarossa Nera", provando differenti tipi e concentrazioni di auxine.

Nel secondo anno di ricerca, lo studio è stato incentrato invece sulla biotizzazione. In particolare, sono stati utilizzati due ceppi di *Sinorhizobium meliloti*: il ceppo selvatico WT 1021 e il suo derivato RD64, che sintetizza IAA 39 volte di più rispetto al tipo selvatico, per valutare le loro *performance* nell'induzione alla radicazione dei semi sintetici di citrange Carrizo. Sempre nel secondo anno, il progetto ha riguardato la micorrizzazione *ex vitro* di talee radicate *in vitro* di citrange Carrizo. L'obiettivo in quel caso è stato quello di valutare se la somministrazione al momento del trapianto dell'inoculo micorrizico commerciale di *Glomus intraradices* (Ozor, Bioplanet) favorisca un maggior tasso di sopravvivenza delle plantule durante la fase di acclimatamento.

Al terzo anno, la ricerca è stata focalizzata su un altro importante portinnesto di agrumi, il citrange C35. Considerati i precedenti lavori condotti sull'incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo (Germanà *et al.*, 2011; Chiancone *et al.*, 2012), è stata valutata la risposta delle microtalee incapsulate di C35 a differenti tipi e concentrazioni di auxine.

2. RADICAZIONE ED INCAPSULAMENTO DI TALEE VITRO-DERIVATE DI CITRANGE [*Citrus sinensis* (L.) OSB. X *Poncirus trifoliata* (L.) RAF] CARRIZO

2.1 Introduzione

Il citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf] Carrizo è un importante portinnesto degli agrumi diffuso in tutto il mondo per la sua tolleranza al virus della tristezza degli agrumi (CTV) (Germanà *et al.*, 2011). La domanda di questo portinnesto aumenta in maniera costante e per tale motivo, un metodo efficiente per la produzione di piante di citrange Carrizo *true-to-type* e *virus-free* risulta importante per il vivaismo agrumicolo. I portinnesti degli agrumi vengono usualmente propagati per seme perché caratterizzati da poliembrionia. La micropropagazione, insieme alla tecnologia del seme sintetico può essere una valida alternativa ai metodi tradizionali di propagazione. I semi artificiali o sintetici (propaguli *vitro*-derivati incapsulati in una matrice di alginato di calcio con funzione trofica e protettiva) sono in grado di coniugare i vantaggi della micropropagazione con la facilità di manipolazione, la possibilità di stoccaggio e la facilità di trasporto dei semi gamici (Redenbaugh, 1993). Le elevate potenzialità della tecnologia del seme sintetico sono talvolta limitate dai bassi livelli di conversione ottenuti (Germanà *et al.*, 2007; 2011).

In questo studio, è stata svolta una prova preliminare su talee uninodali *vitro*-derivate di citrange Carrizo, ponendole in coltura su mezzi diversi per il tipo e per la concentrazione auxinica al fine di migliorare la loro risposta rizogena. Il mezzo di coltura che ha indotto la più alta percentuale di radicazione è stato, in seguito, usato come endosperma artificiale in una successiva prova di incapsulamento.

2.2 Materiali e metodi

Rizogenesi

La prova di rizogenesi è stata svolta utilizzando porzioni di 1 cm di germogli *vitro*-derivati di citrange Carrizo (Fig. 1-a) e provando 6 mezzi di coltura differenti per la componente auxinica. Il mezzo di riferimento utilizzato è stato quello messo a punto da Al-Bahrany (2002) (R5) costituito da sali minerali e vitamine MS (Murashige and Skoog 1962), 0,1 g/l di mioinositolo, 1,0 mg/l di piridossina, 0,2 mg/l di tiamina, 1,0 mg/l di acido nicotinico, 30 g/l di saccarosio, 0,5 mg/l di acido naftalenacetico (NAA), e 2,0 mg/l di acido indol-3-butyrico (IBA), 8,5 g/l di Plant

Agar (Micropoli). Gli altri substrati utilizzati (M1, M2, M3 ed M4) differivano per la combinazione e la concentrazione dei regolatori di crescita in essi contenuti (Tab. 1). E' stato, inoltre, preparato un mezzo di coltura privo di regolatori di crescita (C). Il pH di tutti i mezzi di coltura è stato portato a 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave a 121°C e 104 kPa per 21 minuti. Per ciascuna prova sono stati utilizzati 36 espianti (6 talee/piastra), per un totale di 216 espianti. Le talee sono state incubate a 27 ± 1 °C con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, mediante utilizzo di lampade bianche fluorescenti (TMN 30 W/84; Philips, Suresnes, France) con una densità di flusso fotonico fotosintetico di $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Il monitoraggio delle microtalee è avvenuto con cadenza settimanale per sei settimane ed è stata valutata la percentuale di gemme schiuse, la percentuale di germogliamento (n° di germogli di lunghezza $>0,4$ cm/ n° espianti in coltura $\cdot 100$), la lunghezza media dei germogli, la percentuale di espianti radicati, il numero di radici per espianto radicato e la lunghezza media delle radici. I dati sono stati elaborati ricorrendo all'ANOVA a una via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ($p < 0,05$).

Incapsulamento

Il materiale vegetale utilizzato per gli esperimenti è stato ottenuto dalla proliferazione *in vitro* di germogli derivati da porzioni di semenzali ottenuti da germinazione *in vitro* di citrange Carrizo, posti in coltura su mezzo di coltura (CRM) contenente sali minerali e vitamine Murashige e Skoog (1962), arricchito con 30 g/l di saccarosio, 1,0 mg/l di NAA, 1,0 mg/l di 6-benzilamminopurina (BAP), 8 g/l di agar (Micropoli), pH 5,8. Sono state prelevate porzioni uninodali di 3-4 mm di lunghezza, con due gemme ascellari, e da cui sono state eliminate le foglie. L'incapsulamento (Fig. 1-b) è stato eseguito secondo il protocollo riportato da Micheli e Standardi (2005), utilizzando i mezzi CRM (Germanà *et al.*, 2011) ed R5 (Al-Bahrany, 2002), con o senza (HF) regolatori di crescita, con e senza un pretrattamento (conservazione delle microtalee prima dell'incapsulamento per 7 gg a 4°C, seguita da immersione delle capsule in una soluzione 5,0 mg/l di IBA e 15 g/l di saccarosio, per 3 gg a 4°C al buio) secondo gli schemi riportati in tabella 1. In ogni scatola Petri sono state poste 6 capsule (Fig. 1-c) e per ciascun trattamento sono stati utilizzati 36 semi sintetici. Le colture sono state incubate in una camera di crescita a 27 ± 1 °C con 16 ore di luce e 8 di buio ed una densità di flusso fotonico fotosintetico di $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I dati sono stati rilevati per 45 giorni a partire dalla semina e con cadenza settimanale. In particolare, sono stati registrati: la vitalità (% di espianti di aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti), la ripresa (% di microtalee incapsulate che producono germogli di lunghezza superiore > 4 mm) e la conversione (emergenza di germogli e radici lunghi almeno 4

mm dalle microtalee incapsulate). Inoltre, sono stati monitorati il numero di germogli per espianto, il numero di radici per espianto radicato, la lunghezza dei germogli e la lunghezza delle radici.

2.3 Risultati e discussioni

Rizogenesi

Dopo 10 giorni di coltura erano già presenti i primi germogli (lunghezza ≥ 4 mm); la radicazione è iniziata 15 giorni dopo la messa in coltura delle talee (Fig. 1 d-e). I risultati della prova di rizogenesi sono riportati in tabella 1. Per quanto concerne la percentuale di radicazione, il dato ottenuto dagli espianti posti su mezzo R5 (Al-Bahrany, 2002) (53%) è risultato statisticamente superiore a quello ottenuto sul mezzo di controllo (6%). I risultati ottenuti dagli espianti posti sugli altri mezzi di coltura sono statisticamente intermedi tra questi due valori estremi. I dati ottenuti confermano quanto riferito da Montoliu *et al.* (2010), che riporta una percentuale di radicazione pari a 53,2% degli espianti posti sul mezzo R5, che è risultato il migliore tra quelli provati.

Incapsulamento

Le microtalee hanno mostrato una buona risposta all'incapsulamento. Esse, infatti, si sono mantenute vitali, conservando un acceso colore verde per tutta la durata dell'esperimento (Fig. 1-f). Inoltre, sin dalla prima settimana, è stato possibile osservare prima l'ingrossamento delle gemme ascellari, e poi lo sviluppo progressivo di germogli. La comparsa delle radici è stata più tardiva; infatti, le prime radici sono state osservate dopo la terza settimana di coltura (Fig. 1-g).

I risultati della prova d'incapsulamento delle microtalee sono riportati in Tabella 2. Dopo 45 giorni di coltura, la vitalità delle microtalee di Carrizo è stata molto alta, infatti per tutti i trattamenti si è attestata sul 100%. Anche i valori della ripresa sono alti, andando dal 100% registrato nel T1 al 22,2% rilevato per il T6. L'analisi statistica ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i trattamenti. Il valore statisticamente più alto è stato osservato per il T1, mentre il più basso per il T6. Gli altri trattamenti hanno fatto osservare valori statisticamente intermedi.

Per quanto riguarda la conversione, i risultati hanno confermato che le microtalee incapsulate di Carrizo hanno difficoltà a radicare inducendo quindi bassi livelli di conversione. Le uniche microtalee incapsulate che hanno radicato sono state quelle del trattamento T1, cioè conservate per 7gg a 4°C prima dell'incapsulamento ed in seguito, immerse in una soluzione di acido indolbutirrico (5mg/l di IBA) e saccarosio (15g/l) e per 3 giorni trattate a freddo (4°C).

I risultati riportati in questo studio sull'incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo conferma i risultati riportati da Germanà *et al.* (2011). Infatti, sia per quanto riguarda la ripresa che, in misura ancora maggiore, per la conversione i migliori risultati sono stati ottenuti seguendo il protocollo riportato da Germanà *et al.* (2011). Inoltre, nel confronto fra i mezzi colturali, nonostante nella prova di radicazione *in vitro* il mezzo R5 abbia dato i risultati migliori, per la conversione delle microtalee incapsulate il CRM si è dimostrato migliore.

2.4 Conclusioni

Un approccio biotecnologico alla propagazione del citrange Carrizo può rappresentare una buona strategia per ottenere in breve tempo un elevato numero di portinnesti tolleranti al virus della tristezza. Questo studio, svolto allo scopo di approfondire le conoscenze sulla rizogenesi ed incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo, ha confermato i risultati di precedenti autori per quanto riguarda la combinazione di auxine. Inoltre, ha confermato che un pretrattamento a freddo effettuato prima dell'incapsulamento e l'immersione in una soluzione contenente auxine favorisce la conversione delle microtalee incapsulate.

In questo studio, viene quindi confermata l'applicabilità della tecnologia del seme sintetico alla propagazione di uno dei più importanti portinnesti degli agrumi a livello mondiale. Ulteriori studi sono necessari al fine di aumentare la risposta rizogena delle microtalee *in vitro* e, soprattutto, la conversione dei propaguli incapsulati, per favorire l'applicazione pratica di tale strumento biotecnologico al comparto vivaistico, così come alla conservazione del germoplasma e allo scambio di materiale vegetale.

Tabelle

Tabella 1. Influenza del mezzo di coltura su diversi parametri vegetativi delle microtalee, dopo 45 giorni di coltura *in vitro*.

TESI	Germogliamento	L germogli	Radicazione	Radici	L radici
	%	(cm)	%	n°	(cm)
M1	32,0	1,1 a	31,0 ab	3,4	2,3
M2	27,0	1,0 a	14,0 bc	2,0	1,6
M3	27,0	0,7 ab	44,0 ab	1,3	1,4
M4	29,0 ^{ns}	1,0 a	36,0 ab	1,4 ^{ns}	1,1 ^{ns}
R5	34,0	0,7 ab	53,0 a	1,6	2,4
C	43,0	0,6 b	6,0 c	1,0	2,0

Per ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per $p < 0,05$, (ANOVA a una via, test di Tukey, $p \leq 0,05$)

M1: 1,0 mg/l NAA, 1,0 mg/l IBA;

M2: 2,0 mg/l NAA, 2,0 mg/l IBA;

M3: 1,0 mg/l IBA, 1,0 mg/l IAA;

M4: 2,0 mg/l IBA, 2,0 mg/l IAA;

C: nessun regolatore di crescita.

Tabella 2. Influenza della composizione dell'endosperma artificiale e del substrato di semina su diversi parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni di coltura *in vitro*

Trattamento	Vitalità	Ripresa	Conversione
	%	%	%
T1	100,0	100 a	17,0
T2	100,0	50,0 b	-
T3	100,0	47,2 b	-
T4	100,0 ^{ns}	50,0 b	-
T5	100,0	61,1 b	-
T6	100,0	22,2 c	-

Per ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per $p < 0,05$, (ANOVA a una via, test di Tukey, $p \leq 0,05$)

Legenda

Trattamento	Pretrattamento	Endosperma	Mezzo di semina
T1	Si	CRM	CRM HF
T2	No	R5	R5 HF
T3	No	R5 HF	R5
T4	No	R5	R5
T5	No	R5 HF	R5 HF
T6	Si	R5	R5 HF

Figure

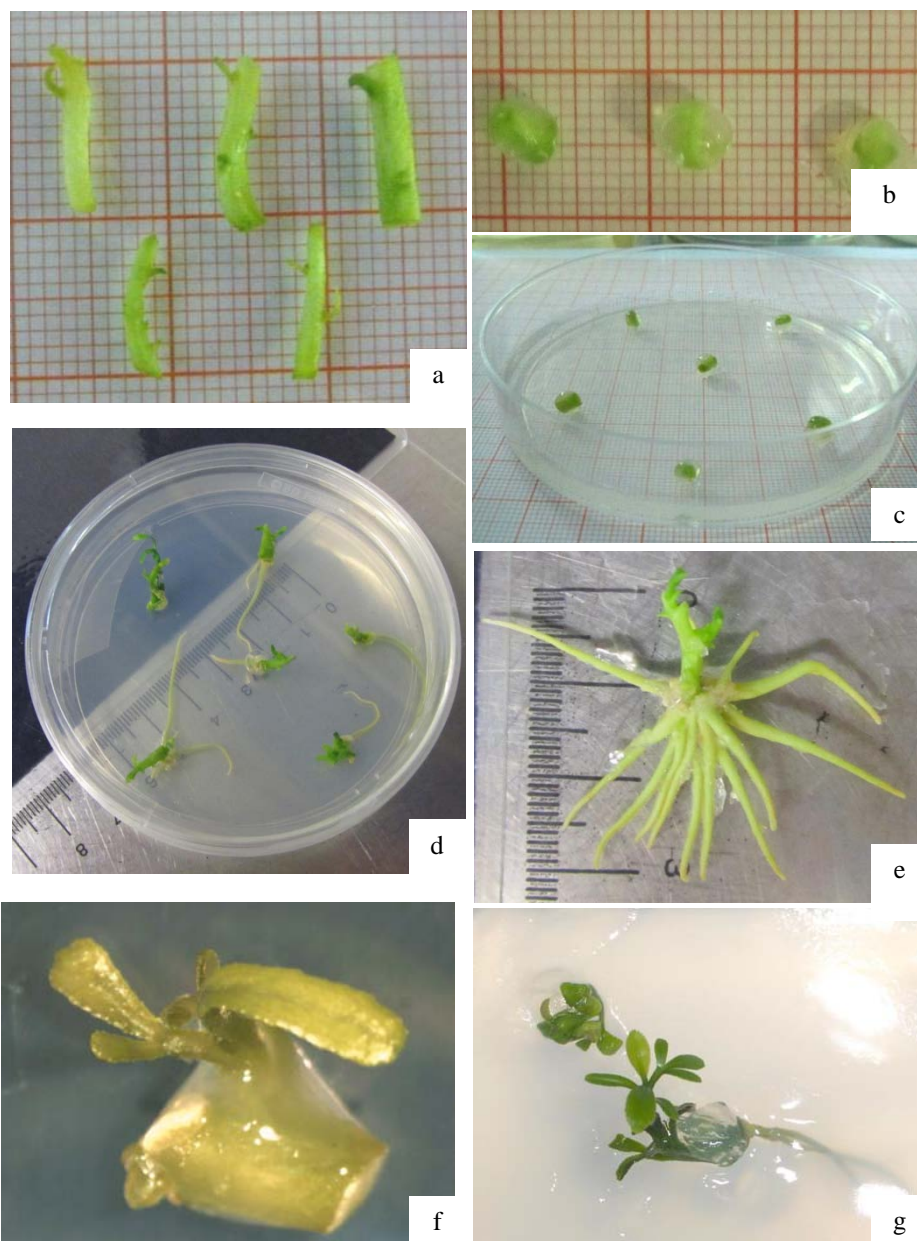


Figura 1 – a) Talee *vitro*-derivate di citrange Carrizo; b) Microtalee di citrange Carrizo incapsulate; c) Capsule di citrange Carrizo *in vitro*; d) Radicazione *in vitro* di talee di citrange Carrizo; e) Talea radicata di citrange Carrizo f) Ripresa di capsule di Carrizo *in vitro* g) Conversione di capsule di citrange Carrizo *in vitro*

3. RISULTATI PRELIMINARI SULLA BIOTIZZAZIONE DI PROPAGULI INCAPSULATI VITRO-DERIVATI DI CITRANGE [*Citrus sinensis* (L.) OSB. X *Poncirus trifoliata* (L.) RAF.] CARRIZO

3.1 Introduzione

Il citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], è uno dei più importanti portinnesti di agrumi, a causa delle buone caratteristiche produttive e qualitative fornite alla cultivar innestata su di esso, così come per la sua resistenza nei confronti di Citrus Tristeza Virus (CTV), che ha causato la morte di milioni di piante di arancio dolce innestate su arancio amaro in tutto il mondo. In Italia, a causa della scarsità di piante madri per la produzione di seme, è spesso necessario importare semi o piante dall'estero (Starrantino e Caruso, 1988) o trovare un metodo efficace, per propagare rapidamente e facilmente un gran numero di questo portinnesto. La tecnologia dell'incapsulamento rappresenta un nuovo strumento per integrare la micropropagazione nell'attività vivaistica. Essa consente di unire i vantaggi dei semi zigotici o gamici con quelli della micropropagazione. Il seme sintetico o seme artificiale, descritto come "embrione somatico artificialmente incapsulato, germoglio o altro tessuto che può essere utilizzato per la semina *in vitro* o in condizioni *ex vitro*" (Aitken-Christie *et al.*, 1995), sarà un potente strumento di propagazione nelle mani dei vivaisti, se il suo livello di conversione aumenterà anche nei vivai, senza l'asepsi di laboratori *in vitro* e con la presenza di microrganismi anche parassiti, come batteri e funghi, responsabili di contaminazione e/o di competizione trofica.

I batteri promotori della crescita delle piante (PGPB) sono batteri del suolo non patogeni in grado di facilitare la crescita e lo sviluppo delle piante sia direttamente che indirettamente (Lugtenberg e Kamilova, 2009). La stimolazione diretta può comprendere l'aiuto nell'assorbimento dell'azoto, dei fitormoni, del ferro e del fosforo, mentre la stimolazione indiretta della crescita delle piante comprende la protezione della pianta contro le malattie del terreno causate da funghi, batteri, virus e nematodi (biocontrollo). Inoculando le piante con questi batteri si può anche fornire bioprotezione contro stress abiotici quali la tossicità dei metalli, la siccità e la salinità (Bashan e de- Bashan, 2005). I PGPB svolgono queste funzioni attraverso enzimi specifici, che portano a cambiamenti fisiologici nelle piante. La biotizzazione, dunque, si propone come un modo per proteggere le piante contro lo stress ambientale aumentando la sostenibilità della produzione agricola.

Inoltre, la biotizzazione di piante micropropagate, prima o dopo il passaggio *ex vitro*, con l'aggiunta di microrganismi benefici, come i funghi simbionti micorrizici arbuscolari (AMF) ed i PGPB, ai propaguli per il controllo diretto dei parassiti o per stimolare la crescita del materiale vegetale, può creare una rizosfera vantaggiosa per gli espianti ottenuti con la micropropagazione, aumentando i livelli di successo dell'acclimatazione. La morfogenesi della radice è strettamente legata all'omeostasi ormonale, con diversi ormoni (auxine, citochinine, etilene, acido abscissico, acido salicilico, acido jasmonico, ecc.) che controllano l'allungamento cellulare, la divisione cellulare ed il ri-orientamento della crescita. L'auxina più attiva nelle piante è l'acido indol- 3-acetico (IAA), ed il suo gradiente di concentrazione ha notevoli effetti sulla formazione delle radici laterali e la loro ramificazione, due componenti chiave dei meccanismi di risposta indotti nelle piante in condizioni di stress. Un sistema transitorio per il rilascio locale e continuo di basse dosi di IAA nei noduli del tessuto radicale è già stato utilizzato (Bianco e Defez, 2009; Bianco e Defez, 2010). Sebbene in letteratura vi siano numerosi studi riguardanti l'applicazione della tecnologia di incapsulamento attraverso l'uso di espianti vitro - derivati unipolari (Micheli *et al.*, 2007; Pattnaik e Chand 2000; Rai *et al.*, 2009; Sicurani *et al.*, 2001), compreso il citrange Carrizo (Germanà *et al.*, 2011), pochi sono gli studi sull'introduzione dei PGPB in capsule di alginato di calcio di microtalee *vitro*-derivate incapsulate. La maggior parte delle applicazioni dei PGPB riguardano l'uso di tali microrganismi in condizioni *ex vitro* per valutare la percentuale di sopravvivenza e la resistenza allo stress biotico ed abiotico di piantine micropropagate (Bashan *et al.*, 2008). Altri lavori riguardano invece applicazioni *in vitro* dei PGPB ai germogli *vitro*-derivati, ma non a livello di seme sintetico (Young *et al.*, 2006; Mirza *et al.*, 2001). Per studiare l'effetto della biotizzazione durante la fase di incapsulamento, esperimenti preliminari sono stati condotti introducendo i PGPB insieme alle microtalee *vitro*-derivate di citrange Carrizo nella matrice di alginato di calcio. Il *Sinorhizobium meliloti* wild type ceppo 1021 e il suo derivato RD64, che sintetizza 39 volte più IAA rispetto al ceppo wild type, sono stati utilizzati per valutare la loro efficacia nell'indurre radicamento di microtalee utilizzate per preparare i semi sintetici.

3.2 Materiali e metodi

Germogli di citrange Carrizo, coltivati *in vitro* su un mezzo di proliferazione (PM) contenente sali minerali e vitamine Murashige e Skoog (1962), arricchito con 30 g/l di saccarosio, 1,0 mg/l di NAA, 1,0 mg/l di 6-benzilamminopurina (BAP), 8 g/l di agar (Micropoli), pH 5,8, sono stati tagliati in microtalee uninodali di 3-4 mm di lunghezza, senza foglie e con due gemme ascellari,

che sono state incapsulate. Il protocollo di incapsulamento è stato eseguito secondo Germanà *et al.* (2011), utilizzando come endosperma artificiale il mezzo di proliferazione a mezza concentrazione addizionato con 50 g l⁻¹ di saccarosio (PM/2). Per studiare come la presenza dei PGPB (*Sinorhizobium meliloti* ceppo wild type 1021 e il suo derivato RD64 in grado di sintetizzare 39 volte più IAA) influenzi il rendimento delle microtalee incapsulate in coltura sono stati effettuati i seguenti quattro esperimenti. Tutti i dati riportati nelle tabelle sono stati ottenuti dopo 45 giorni di trattamento.

Esperimento 1: Effetto di due diversi ceppi batterici (1021 e RD64) nell'endosperma artificiale.

Per studiare l'influenza dei due ceppi di PGPB sulle *performance* delle microtalee incapsulate, e gli effetti della sintesi di IAA da parte di questi batteri nell'endosperma artificiale, sono state confrontate quattro tesi:

- a) assenza di auxine e di batteri nell'endosperma artificiale (**PM/2AF**),
- b) aggiunta all'endosperma artificiale di 2×10^7 per ml batteri del ceppo wild type, 1021 (**1021**),
- c) aggiunta all'endosperma artificiale di 2×10^7 batteri per ml del ceppo RD64 che over-produce IAA (**RD64**)
- d) presenza di auxine (NAA) e assenza di batteri nell'endosperma artificiale PM/2 (**PM/2 C**).

Esperimento 2: Effetto di diverse concentrazioni di RD64.

Per studiare l'influenza di due concentrazioni di RD64 sulle prestazioni delle microtalee incapsulate, sono state confrontate quattro tesi:

- a) assenza di auxine e di batteri nell'endosperma artificiale (**PM/2AF**),
- b) aggiunta all'endosperma artificiale di 2×10^7 batteri per ml del ceppo RD64 che over-produce IAA (**RD64**)
- c) aggiunta all'endosperma artificiale di 2×10^8 batteri per ml del ceppo RD64 che over-produce IAA (**RD64 10**)
- d) presenza di auxine (NAA) e assenza di batteri nell'endosperma artificiale PM/2 (**PM/2 C**).

Esperimento 3: Effetto dei diversi metodi di inoculo.

Questo esperimento è stato condotto per selezionare la procedura di inoculazione più efficace. Tre sistemi di inoculo sono stati valutati:

- a) le microtalee sono state immerse a temperatura ambiente per 48 ore in una soluzione contenente 2×10^7 batteri per ml di RD64 e poi incapsulate (**RD64 PRE**);

- b) le capsule sono state immerse a temperatura ambiente per 48 ore in una soluzione contenente 2×10^7 batteri per ml di RD64 (**RD64 POST**),
- c) la procedura di incapsulamento è stata effettuata con un endosperma artificiale addizionato con 2×10^7 batteri per ml di RD64 (**RD64 PM/2 C**).

Esperimento 4: Effetto dei diversi substrati di semina.

Per studiare la possibilità di applicare la tecnologia di incapsulamento all'attività vivaistica, due substrati di semina sono stati testati. Capsule preparate con endosperma PM/2 AF addizionato con 2×10^7 batteri per ml di RD64 sono state seminate su: a) mezzo PM agarizzato senza regolatori di crescita (PMHF) e b), carta da filtro bagnata con 10 ml di terreno PMHF liquido.

Per ogni esperimento e per ogni tesi sono state preparate 30 capsule. Quando non è specificato, le capsule sono state seminate in vasetti di vetro da 500 ml (10 capsule per barattolo), contenenti 50 ml del mezzo proliferazione di cui sopra, senza regolatori di crescita (PMHF). Tutte le colture sono state poste in una camera di crescita condizionata a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ con 16 ore di luce e 8 ore di buio, con la luce fornita da lampade fluorescenti bianchi alla densità di flusso fotonico fotosintetico di $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Le colture sono state monitorate ogni settimana per osservare lo sviluppo dei propaguli. Dopo 45 giorni, sono stati misurati i seguenti parametri vegetativi: vitalità (espianti con un aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti), la ripresa (microtalee incapsulate che producono germogli $> 4 \text{ mm}$), conversione (estrazione simultanea di germogli e radici lunghi almeno 4 mm dalle microtalee incapsulate), il numero e la lunghezza dei germogli e delle radici. Ciascun parametro è stato analizzato mediante analisi della varianza a una via (ANOVA) seguita dal test di Tukey a confronto multiplo ($p < 0,05$).

3.3 Risultati e discussioni

Durante la coltura, le microtalee incapsulate hanno mantenuto il loro colore verde e il loro turgore (Fig. 1-a). Dopo 10 giorni *in vitro*, le gemme hanno cominciato a germogliare (Fig. 1-b) ed i germogli a crescere (Fig. 1-c). Le prime radici sono comparse dopo due settimane di coltura, crescendo in lunghezza e numero (Fig. 1-d). Dopo 45 giorni, il numero di germogli, per ogni capsula, è variato da 1,0 a 1,4, con una lunghezza media compresa tra 4,4 e 12,0 mm. Il miglior risultato (1,4 germogli, 12 mm di lunghezza) è stato ottenuto nella tesi RD64 PRE, dove le microtalee sono state sottoposte ad una immersione per 48 ore in una sospensione contenente 2×10^7 di RD64, prima dell'incapsulamento. Per ogni microtalea incapsulata, da 0 a 3,3 radici sono state prodotte e la loro lunghezza è variata da 1,0 a 42,7 mm. Le radici più lunghe (RD64) sono

state osservate nelle microtalee con meno radici. Nessuna radice è stata ottenuta nelle capsule seminate su carta (Fig. 1-e).

I risultati dell'analisi statistica effettuata sono riportati nelle tabelle 1-4.

Esperimento 1: Effetto di due diversi ceppi batterici (1021 e RD64) nell'endosperma artificiale. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per la vitalità e la ripresa. L'introduzione del batterio modificato RD64 nell'endosperma artificiale ha fornito una conversione statisticamente superiore (16,7%), non solo ai risultati ottenuti in assenza di alcun batterio (PM/2C) e in assenza di auxine (PM/2AF) (in entrambi i casi del 3.3%), ma anche quelli ottenuti in presenza del ceppo wild type 1021; in quest'ultimo caso, infatti, non è stata registrata alcuna conversione.

Esperimento 2: Effetto di diverse concentrazioni RD64. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per vitalità e ricrescita, anche se per entrambi i parametri, i valori più bassi sono stati osservati nella tesi RD64 10, in cui all'endosperma era stata aggiunta una quantità 10 volte superiore di inoculo batterico. Nel caso del parametro conversione, il risultato statisticamente più alto è stato ottenuto per la tesi RD64 (16.7%), mentre le altre tesi hanno fatto osservare risultati statisticamente uguali (3.3%).

Esperimento 3: Effetto di diversi metodi di inoculo. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per i parametri vitalità e ripresa, sebbene, l'inoculo effettuato dopo l'incapsulamento (RD64 POST) ha dato risultati più scarsi (rispettivamente, 96.7% e 86.7%). Riguardo alla conversione, la conversione statisticamente più alta è stata osservata nella tesi RD64 (16.7%), le altre due tesi, invece non mostravano nessuna differenza fra loro.

Esperimento 4: Effetto di diversi substrati di semina. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per la vitalità e la ripresa, anche se la semina su agar ha indotto una ripresa più elevata (96,7 %) rispetto alla semina su carta da filtro (86,7 %). Statisticamente superiore è stata la conversione osservata in capsule seminate su agar (RD64 AGAR).

I risultati ottenuti in esperimenti precedenti sull'effetto del substrato di semina sul livello di conversione dei semi sintetici effettuato usando la carta da filtro come substrato di semina, ha fornito risultati diversi, probabilmente a causa del genotipo e del tipo di propagulo (Germanà *et al.*, 2007). In particolare, i semi sintetici prodotti con embrioni somatici incapsulati di *Citrus reticulata* Blanco e seminati su carta da filtro avevano fornito migliori *performance*, in termini di vitalità, ripresa e conversione, rispetto ad altri substrati (Germanà *et al.*, 2007). D'altra parte, studi precedenti hanno dimostrato che microtalee incapsulate di *Morus nigra* non hanno mostrato differenze statisticamente significative quando seminate su terreno agarizzato o su carta da filtro (Chiancone *et al.*, 2006).

Nel presente studio, nella tesi RD64 (applicando alle microtalee un pretrattamento a freddo a 4 °C per 7 giorni e poi un trattamento di radicazione dopo l'incapsulamento), sono stati ottenuti valori di conversione simili a quelli ottenuti da Germanà *et al.* (2011), incapsulando propaguli *vitro*-derivati di citrange Carrizo. Applicando la biotizzazione sono state osservate radici significativamente più lunghe (42,7 millimetri contro 20,0 millimetri).

3.4 Conclusioni

In questo studio, i PGPB sono stati aggiunti all'endosperma artificiale, per migliorare le prestazioni di microtalee incapsulate di citrange Carrizo. In particolare, è stato dimostrato che l'aggiunta del ceppo modificato di *S. meliloti*, l'RD64, a bassa concentrazione di inoculo e la semina delle capsule su terreno agarizzato ha fornito una conversione soddisfacente, senza effetti negativi sulla vitalità e sulla ripresa. I risultati qui presentati mostrano che la biotizzazione potrebbe essere associata alla tecnologia del seme sintetico, poichè promuove il radicamento di microtalee incapsulate di citrange Carrizo. Ulteriori studi sono necessari per aumentare il livello di conversione di microtalee incapsulate di citrange Carrizo, valutando eventualmente diverse concentrazioni di inoculo e altri ceppi batterici.

Tabelle

Tabella 1 Effetto della presenza dei ceppi 1021 e RD64 di *S. meliloti* sui parametri vegetativi microtalee incapsulate dopo 45 giorni di coltura *in vitro*

TESI	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Conversione (%)	
PM/2C	100,0	96,7	3,3	b
PM/2AF	100,0	96,7	3,3	b
1021	100,0	90,0	0,0	b
RD64	100,0	96,7	16,7	a
	ns	ns		

All'interno di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere diverse sono statisticamente differenti per $p < 0,05$, (ANOVA, test di Tukey, $p < 0,05$)

PM/2C: mezzo di proliferazione a metà concentrazione, con aggiunta di 50 g l^{-1} di saccarosio

PMAF: PM/2 endosperma artificiale senza auxine (Germanà *et al.*, 2011)

1021: 2×10^7 batteri per ml

RD64: 2×10^7 batteri per ml

Tabella 2. Effetto di due concentrazioni di RD64 sui parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni di coltura *in vitro*

TESI	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Conversione (%)	
PM/2C	100,0	96,7	3,3	b
PM/2AF	100,0	96,7	3,3	b
RD64	100,0	96,7	16,7	a
RD64 10	96,7	73,3	3,3	b
	ns	ns		

All'interno di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere diverse sono statisticamente differenti per $p < 0,05$, (ANOVA, test di Tukey, $p < 0,05$)

PM/2C: mezzo di proliferazione a metà concentrazione, con aggiunta di 50 g l^{-1} di saccarosio

PMAF: PM/2 endosperma artificiale senza auxine (Germanà *et al.*, 2011)

RD64: 2×10^7 batteri per ml

RD64 10: 2×10^8 batteri per ml

Tabella 3. Effetto di diversi metodi di inoculo sui parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni di coltura *in vitro*

TESI	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Conversione (%)	
RD64	100,0	96,7	16,7	a
RD64 POST	96,7	86,7	3,3	b
RD64 PRE	100,0	90,0	1,3	b
	ns	ns		

All'interno di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere diverse sono statisticamente differenti per $p < 0,05$, (ANOVA, test di Tukey, $p < 0,05$)

RD64: 2×10^7 batteri per ml

RD64 POST: immersione delle capsule a temperature ambiente per 48 h in una sospensione 2×10^7 batteri per ml, prima della coltura *in vitro*.

RD64 PRE: immersione delle microtalee a temperature ambiente per 48 h in una sospensione 2×10^7 batteri per ml, prima dell'incapsulamento.

Tabella 4. Effetto del substrato di semina sui parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni di coltura *in vitro*

TESI	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Conversione (%)	
RD64 AGAR	100,0	96,7	16,7	a
RD64 CARTA	96,7	86,7	0,0	b
	ns	ns		

All'interno di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere diverse sono statisticamente differenti per $p < 0,05$, (ANOVA, test di Tukey, $p < 0,05$)

RD64 AGAR: capsule seminate su mezzo agarizzato

RD64 CARTA: capsule seminate su carta da filtro

Figure

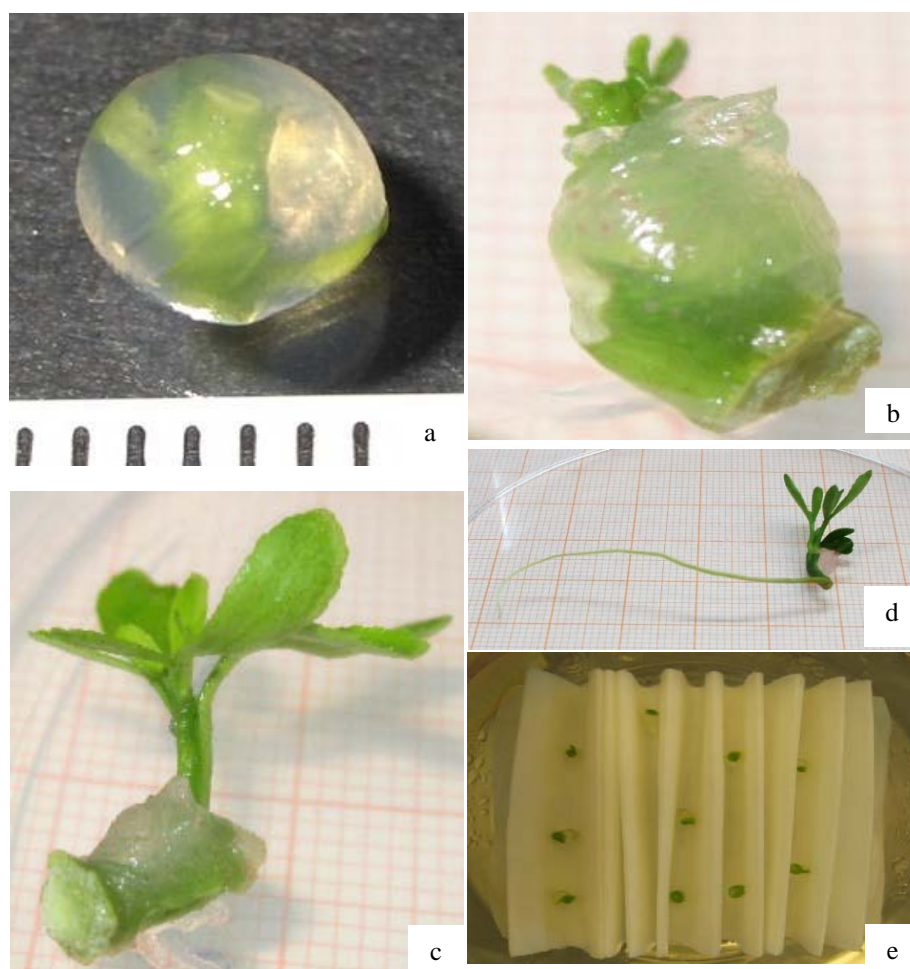


Figura 1 – a) Microtalea di citrange Carrizo incapsulata; b) Ripresa di capsula di Carrizo *in vitro* c) Allungamento del germoglio di citrange Carrizo; d) Conversione *in vitro* di microtalea di citrange Carrizo incapsulata e) Semi sintetici di citrange Carrizo seminati su carta.

4. MICORRIZZAZIONE *EX-VITRO* DI PIANTINE *VITRO*-DERIVATE DI CITRANGE [*Citrus sinensis* (L.) OSB. × *Poncirus trifoliata* (L.) RAF.] CARRIZO

4.1 Introduzione

I Funghi Micorrizici Arbuscolari (AMF) sono endomicorrize prodotte da funghi appartenenti alla divisione *Glomeromycota*, genere *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Sclerocystis*. Tali funghi colonizzano a livello inter ed intracellulare l'epidermide della radice ed il parenchima corticale della maggior parte delle specie vegetali. In questa associazione mutualistica, l'esteso micelio extramateriale si sviluppa nel suolo, migliorando sia la struttura del terreno, sia l'assorbimento di diversi elementi e ioni minerali (in particolare, fosforo). Questi ultimi vengono traslocati dal suolo alla fase miceliare intramateriale, caratterizzata da strutture intra- ed intercellulari, come gomitoli miceliari, vescicole ed arbuscoli (questi, particolarmente attivi negli scambi trofici) e, quindi, rilasciati nelle cellule della radice. Viceversa, parte dei fotosintetati dell'ospite vengono trasmigrati alla radice e ceduti al fungo simbiote a livello degli arbuscoli. Tale simbiosi, inoltre, induce alla pianta tolleranza a stress biotici e abiotici (Schenck, 1981; Harley e Smith, 1983; Abbott e Robson, 1986; Pfleger e Lindermann, 1996).

La presenza di AMF nei *Citrus* è stata descritta, per la prima volta, nel 1933 (Reed e Freemont, 1935). Successivamente è stato rilevato che le micorrize, in piante come gli agrumi, caratterizzate da un sistema radicale relativamente grossolano e con bassa efficienza nella fornitura di nutrienti, ne migliorano la nutrizione minerale ed idrica (Baylis, 1970; Menge *et al.*, 1978; Nemec, 1978; Syvertsen e Graham, 1999). La dipendenza micorrizica degli agrumi può variare notevolmente a seconda del genotipo, del tipo di terreno e dell'efficienza del fungo (Cardoso *et al.*, 1986; Dutra *et al.*, 1996; Graham e Syvertsen, 1985; Nemec, 1977; Raman e Mahadevan, 1996; Vinayak e Bagyaraj, 1990). Nemec (1978), studiando l'influenza degli AMF sulla crescita di diversi portinnesti di agrumi, ha osservato che, tra le varie specie e cultivar, citrange Troyer [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] risultava il meno dipendente dall'associazione. Attualmente, i citrange sono tra i più diffusi portinnesti di agrumi, sia per le buone caratteristiche quali-quantitative indotte ai frutti, sia per la loro tolleranza al Citrus Tristeza Virus (CTV) (Germanà *et al.*, 2011). La richiesta, nel mercato, di questi portinnesti è, quindi, in costante aumento, tanto da giustificare la messa a punto di metodi efficaci per la produzione di piante *true-to-type* e virus-esenti, anche attraverso la coltura *in vitro* di tessuti vegetali. Uno dei maggiori limiti che caratterizzano le tecniche di micorpropagazione

è, però, il basso tasso di sopravvivenza e il ridotto sviluppo durante la fase di acclimatazione. E' possibile ipotizzare che l'inoculazione delle piante micropropagate con AMF, in coincidenza con il loro passaggio dal *vitro* alle condizioni *in vivo*, potrebbe migliorare le loro prestazioni durante l'acclimatazione (Branzanti *et al.*, 1992; Cordier *et al.*, 1996; Kapoor *et al.*, 2008; Quatrini *et al.*, 2003; Pons *et al.*, 1983). Si è ritenuto opportuno, pertanto, studiare l'evoluzione della colonizzazione micorrizica e la risposta nelle prestazioni vegetative di giovani piante micropropagate di citrange Carrizo inoculate artificialmente con *Rhizophagus intraradices* (NC Schenck e GS Sm.) C. Walker e A. Schüßler (sin.: *Glomus intraradices* NC Schenck e GS Sm.).

4.2 Materiali e metodi

Materiale vegetale e inoculazione. L'esperimento è stato condotto su piantine *vitro*-derivate di citrange Carrizo, ottenute da microtalee, come riportato da Germanà *et al.*, (2011). In media, sono state selezionate piantine lunghe 5 centimetri e con 3 radici, (Fig. 1-a). L'inoculazione è stata eseguita con frammenti di micelio e spore di *R. intraradices* (Ozor, Bioplanet), in coincidenza con il passaggio delle piantine dal *vitro* a condizioni di *ex vitro*. E' stata utilizzata la densità suggerita dal produttore: 500 mg di inoculo (500 propaguli/g) sono stati diluiti in 1 L di una miscela di sali di Murashige e Skoog (1962) a metà concentrazione e quindi, 40 ml sono stati somministrati ad ogni piantina (10 propaguli/piantina). I saggi sono stati allestiti impiegando un totale di 80 piantine, distribuite in 4 blocchi da 20. In particolare, le piantine sono state trapiantate in vasi (diametro di 10 cm) contenenti torba commerciale, sabbia e perlite (2:2:1, v/v/v) e sono state confrontate quattro tesi:

1. **piante inoculate in substrato sterile** (2 cicli di sterilizzazione a 120 °C, 1 atm, per 1 ora, a distanza di 24 ore; + M/+ S),
2. **non inoculate in substrato sterile (- M/+ S),**
3. **inoculate in substrato non-sterile** (contenente, quindi, anche una popolazione nativa di AMF; + M /- S),
4. **piante non inoculate in substrato non - sterile (- M/ -S).**

Per le tesi - M, 40 ml di soluzione di sali di Murashige e Skoog (1962) a mezza concentrazione sono state distribuiti in ciascun vaso. Le piantine sono state acclimate in una camera di crescita a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni di luce naturale. Per i primi 15 giorni di coltura, sono stati utilizzati sacchetti trasparenti di polivinile per coprire i vasetti e ridurre la disidratazione delle piantine.

Individuazione della densità di spore fungine AM e stato di micorrizazione. Al momento dell'allestimento dei saggi, nella massa di substrato opportunamente miscelato, è stata valutata la

densità di popolazione di *Glomeromycota* nativi. La valutazione della densità del numero di spore di AMF (nativi o inoculati) è stata effettuata anche al termine della prova, in tutte le 4 tesi. In entrambi i casi, le spore degli AMF sono state estratte e contate, impiegando la tecnica proposta da Jenkins, modificata da Walker *et al.* (1982).

Aliquote di 5 g di substrato sono state disperse in 200 ml di acqua corrente ed agitate per 10 minuti. La sospensione ottenuta è stata filtrata attraverso due setacci con maglie di 250 e 50 µm, recuperando il residuo depositato sul secondo setaccio, attraverso l'ausilio di uno spruzzo d'acqua, in un tubo da centrifuga da 100 ml. Si è proceduto quindi con una prima centrifugazione a 2000 giri per 5 minuti; dopo aver eliminato il supernatante e aggiunto 50 ml di una soluzione di saccarosio al 40%, è stata effettuata una seconda centrifugazione a 2000 giri per 2 minuti. Il supernatante ottenuto è stato quindi versato in una siringa montata su un dispositivo di filtrazione in policarbonato (Sartorius 16508B), dotato di un filtro in microfibra di vetro (50 mm di diametro). Dopo successivi risciacqui con acqua per eliminare il più possibile i residui di saccarosio, è stato prelevato dal dispositivo il filtro su cui si erano depositate le spore presenti in quel campione di terreno. Allo stereomicroscopio si è proceduto quindi alla loro visualizzazione, conta e, in alcuni casi, recupero con l'ausilio di una micropipetta.

Per visualizzare lo stato di colonizzazione degli AMF nei tessuti radicali, da ciascuna pianta sono stati prelevati tre campioni di radici laterali, da sottoporre ad un'opportuna tecnica di decolorazione e colorazione di contrasto con fucsina acida. In particolare, è stata applicata la tecnica di Phillips e Haymann (1970), modificata da Torta *et al.* (2003).

I campioni di radici sono stati immersi in una soluzione acquosa di KOH al 10%, e trattati termicamente a bagnomaria (90°C) per 8-12 ore. Sono stati effettuati, quindi, ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile per eliminare l'eccesso di KOH e si è proceduto con l'acidificazione del mezzo con una soluzione acquosa di HCl al 10% (utilizzato come mordente). I frammenti, posti quindi in una soluzione di lattofenolo contenente 0,1% di fucsina acida, sono stati portati all'ebollizione per 5 minuti al fine di colorare le eventuali strutture fungine intramatrici presenti. I frammenti così trattati, immersi in lattofenolo, sono stati osservati allo stereomicroscopio.

L'indice di micorrizzazione ($IM = \% \text{ del tessuto colorato, rispetto alla porzione ialina, relativo all'unità di lunghezza della radice}$) è stato determinato in tre frammenti, calcolandone il valore medio. Infine, alcuni frammenti radicali, sezionati longitudinalmente e trasversalmente, sono stati montati su vetrino con una goccia di lattofenolo e, allo scopo di evidenziare le strutture fungine endomicorriziche (ife, gomitoli ifali, vescicole e arbuscoli), e osservati al microscopio ottico.

Influenza dell'inoculo e del substrato sterile sui parametri vegetativi. I seguenti parametri vegetativi sono stati misurati durante le condizioni *in vitro*, subito prima del trapianto: altezza (cm) e peso (g) delle piantine, numero (n°) di foglie, numero (n°) e lunghezza (cm) delle radici avventizie (RA: radici che si sono originate direttamente dalla base della piantina). Dopo 90 giorni, sono stati anche rilevati sia numero (n°) e lunghezza (cm) delle radici laterali di primo ordine (RLPO: radici derivanti dalle radici avventizie), sia numero (n°) e lunghezza (cm) delle radici laterali di secondo ordine (RLSO radici derivanti da RLPO). Questi dati sono stati utilizzati per calcolare le medie. Gli effetti dei due fattori, micorrizzazione (M) e la sterilizzazione del substrato (S) sui dati registrati, sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguita dal test di Tukey a confronto multiplo ($p < 0,05$).

4.3 Risultati

Individuazione della densità di spore fungine AM e stato di micorrizzazione. Un basso numero di spore AMF (3 per grammo di substrato), per lo più appartenenti al genere *Glomus*, è stato inizialmente rilevato nel substrato; tale concentrazione si è costantemente mantenuta nelle tesi con substrato sterile (spore non più vitali) e non sterile. Nel substrato inoculato, in numero di spore /g di terreno non si è incrementato, rispetto alla concentrazione iniziale. L'indice di micorrizzazione (IM), dopo tre mesi, ha raggiunto valori molto contenuti in tutte le quattro tesi (Tabella 1) (Fig. 1-e). I valori più elevati (10%) sono stati registrati nella tesi + M/+ S (un lieve incremento conseguente all'aggiunta dell'inoculo, in assenza di propaguli nativi vitali) e -M/-S (con soli propaguli nativi). Nessuna infezione è stata rilevata nelle piante coltivate nel substrato non inoculato e sterile (-M/+S).

Influenza dell'inoculo e del substrato sterile sui parametri vegetativi. I dati registrati alla fine dell'esperimento (90 giorni), hanno evidenziato che per ciascun parametro, la risposta delle piantine è variata in dipendenza della tesi. Infatti, si è potuto osservare che le plantule non inoculate e coltivate in substrato non sterile (in presenza di AMF vitali: -M/-S), hanno mostrato un notevole aumento nell'altezza (2 cm), nel numero (1,3) e nella lunghezza (3,2 cm) delle radici avventizie (RA), mentre le piantine inoculate in substrato sterile (spore di *R. intraradices*: + M/+ S) hanno raddoppiato il loro peso (da 0,35 a 0,70 g) (dati non riportati). L'analisi statistica effettuata sui dati registrati dopo tre mesi di coltura *in vivo*, ha dimostrato che, per alcuni parametri, in particolare, il peso delle piantine, la lunghezza delle radici laterali di primo ordine ed il numero di radici laterali di secondo ordine, è stata rilevata un'interazione significativa tra i due fattori (M e S) (Tabella 1). Infatti, le combinazioni che hanno indotto le migliori

performance della pianta sono state le tesi + M/+ S e -M/-S (Fig. 1 b-c). Risultati rilevanti sono stati ottenuti nella tesi + M/+ S, in particolare per il numero di RLSO (12.9). Inoltre, in termini di sviluppo radicale ed emissione di nuove radici laterali, la tesi - M/ + S ha mostrato i valori più bassi, probabilmente a causa dell'assenza di microrganismi attivi nel substrato (Fig. 1-d).

Le piantine hanno quindi risposto all'inoculazione di *R. intraradices* e *Glomus* spp. con un leggero aumento della lunghezza delle radici laterali di primo ordine (RLPO) e del numero di radici laterali di secondo ordine (RLSO).

4.4 Conclusioni

Questa indagine, pur confermando la scarsa micorriza-dipendenza di citrange Carrizo, dimostra che l'impiego di AMF (*R. intraradices*, *Glomus* spp.) può indurre migliori *performance* vegetative in piantine micro propagate, durante la fase di acclimatazione. I risultati ottenuti incoraggiano lo studio dell'interazione tra AMF e citrange. Si ritiene opportuno, inoltre, selezionare ceppi fungini con una maggiore efficienza micorrizica, più attivi nella colonizzazione dell'apparato radicale. Lo studio sulla biotizzazione di piante micropropagate piante può prevedere, inoltre, una maggiore densità di inoculo, un differente inoculo AMF commerciale e anche diversi genotipi di citrange, come il Troyer e il C35. I risultati di tali studi possono fornire vantaggi significativi sia per i vivaisti che per gli agricoltori. Infatti, è noto che le piante ben micorrizzate presentano una minore di mortalità, resistono o tollerano diversi stress biotici ed abiotici e migliorano le loro *performance*, garantendo sia redditi più elevati e che riducendo l'impatto sul sistema agricolo.

Tabella

Tabella 1 - Influenza della presenza dell'inoculo e della sterilizzazione del substrato sui parametri vegetativi delle talee radicate e sull'Indice di Micorrizzazione (IM)

Fattori		H	P	F	RA	L RA	RLPO	L RLPO	RLSO	L RLSO	IM
Micorrizzazione	Sterilizzazione Substrato	(cm)	(g)	(n°)	(n°)	(cm)	(n°)	(cm)	(n°)	(cm)	%
+M	+S	6,0	0,7	13,7	3,3	5,9	3,0	6,9	12,9	1,4	10
+M	-S	5,3	0,4	14,3	1,8	4,9	3,4	3,9	2,8	0,7	5
-M	+S	6,8	0,5	14,8	2,4	3,9	2,4	5,1	7,1	0,4	0
-M	-S	8,0	0,7	16,6	3,8	5,9	1,8	5,2	7,1	1,2	10
M		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-
S		ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,021	0,03	ns	-
M x S		ns	0,002	ns	ns	ns	ns	0,015	0,03	ns	-

ANOVA a due vie (M, S), seguita da test di Tukey $p < 0,05$ (nessuna analisi statistica è stata effettuata per IM).

H: Altezza

P: Peso

F: Foglie

L: Lunghezza

RA: radici avventizie

RLPO: Radici Lateralie Primo Ordine

RLSO: Radici Lateralie Secondo Ordine

IM: Indice di Micorrizzazione

Figure

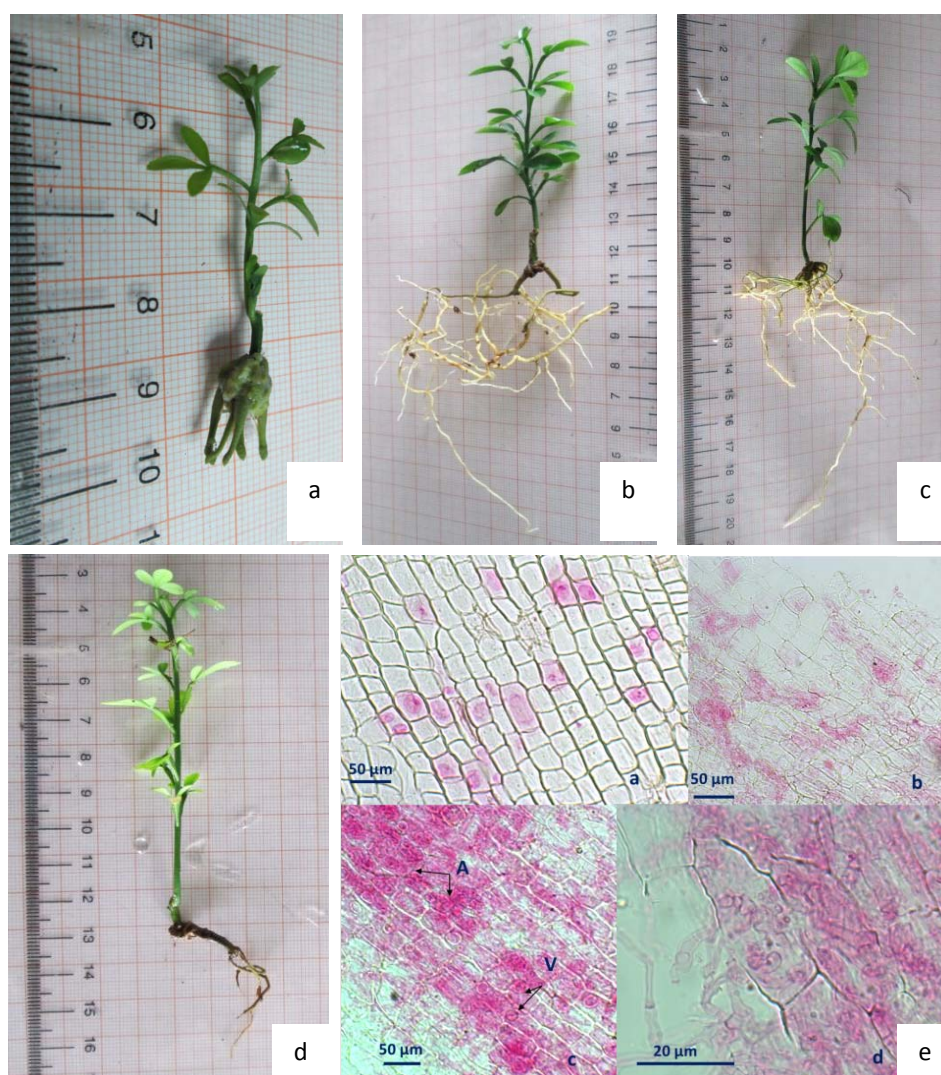


Figura 1 – a) Piantina *vitro*-derivata di citrange Carrizo; b) Piantina inoculata cresciuta su terreno sterile c) Piantina non inoculata cresciuta su terreno non sterile; d) Piantina non inoculata cresciuta su terreno sterile; e) Infezione radicale endomicorrizica nella tesi +M + S: a) inizio dell'infezione delle cellule dell'epidermide; b) evoluzione della colonizzazione del fungo micorrizico arbuscolare nel tessuto corticale; c) piena colonizzazione del tessuto corticale (A= arbuscoli; V= vescicole); d) particolare della crescita intracellulare del fungo.

5. STUDIO SULLA CONVERSIONE DI PROPAGULI INCAPSULATI VITRO-DERIVATI DI CITRANGE[*Citrus sinensis* (L.) OSB. × *Poncirus trifoliata* (L.) RAF.] C35

5.1 Introduzione

Il citrus tristeza virus è una delle più gravi patologie che colpisce l'agrumicoltura. Per combattere questo virus, è possibile utilizzare portinnesti resistenti, come i citrange. Per questo motivo, in Italia, come già è accaduto in altri paesi (ad esempio Stati Uniti, Brasile, Spagna, ecc.), si sta verificando il turnover dell'arancio amaro, il portinnesto di agrumi più usato, dopo i citrange. Questo implica un continuo incremento della domanda per i vivai di portinnesti resistenti.

Il C35 è un ibrido di arancio dolce 'Ruby Blood' ed arancio trifogliato ed è un genotipo promettente, poichè, oltre ad essere tollerante nei confronti del CTV, è tollerante anche *Phytophthora* spp., alla siccità e al freddo. Inoltre, è resistente ai nematodi in combinazione con arancio dolce, e fornisce una migliore qualità dei frutti rispetto al citrange Carrizo, presentando un albero più compatto (Cameron *et al.*, 1986; Forner-Giner *et al.*, 2003).

La coltura *in vitro* può fornire soluzioni innovative per aumentare il numero di piante prodotte in breve tempo e in un spazio ridotto. Pochi lavori sono presenti in letteratura sulla micropropagazione del C35, e sono per lo più concentrati sul ruolo delle citochinine nella moltiplicazione dei germogli (Sen e Dhawan, 2009) e sulla valutazione di diverse fonti di carboidrati per la moltiplicazione *in vitro* (Martinez-Hernandez *et al.*, 2009). Oltre alla micropropagazione, l'incapsulamento potrebbe rappresentare un ulteriore e promettente strumento per la gestione dei propaguli *vitro*-derivati. Il seme sintetico o seme artificiale (synseed) è uno dei prodotti di questa tecnologia, che è stato in precedenza definito come "un singolo embrione somatico incapsulato" (Murashige, 1978), e più tardi è stato indicato come "un embrione somatico artificialmente incapsulato, germogli o altri tessuti che possono essere utilizzati per la semina sotto condizioni di *vitro* o *ex vitro*" (Aitken-Christie *et al.*, 1995). Il seme sintetico unisce i vantaggi di micropropagazione con la maneggevolezza, la conservabilità, le dimensioni ridotte, la possibilità di meccanizzazione e la trasportabilità dei semi gamici (Standardi e Piccioni, 1998; Micheli *et al.*, 2003). Superando specifici problemi che riguardano alcuni aspetti procedurali, l'applicazione dell'incapsulamento per la produzione di seme sintetico può rappresentare una innovazione concreta nell'attività vivaistica (Standardi e Micheli, 2012). L'applicazione di questa tecnologia anche al portinnesto C35 potrebbe essere utile per la sua

produzione su larga scala. Nel presente studio, considerando le precedenti ricerche sull'incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo (Germanà *et al.*, 2011; Chiancone *et al.*, 2012), è stata valutata l'influenza di diversi tipi e concentrazioni di auxine sulla risposta *in vitro* delle microtalee incapsulate di C35.

5.2 Materiali e metodi

Da germogli di C35 proliferati *in vitro*, ottenuti seguendo il protocollo riportato da Germanà *et al.* (2011), sono state prelevate microtalee uninodali di 3-4 mm di lunghezza senza foglie e con due gemme ascellari, e mantenute per 7 giorni a 4 °C (pretrattamento). Queste sono state sottoposte ad un trattamento induttivo di radicazione attraverso l'immersione in una soluzione di 5 mg l⁻¹ IBA e 15 g l⁻¹ di saccarosio (pH 5,5) per 3 giorni in condizioni di buio in camera di crescita a 26±1°C; come controllo (C), alcune microtalee sono state immerse in 15 g l⁻¹ di soluzione di saccarosio, senza regolatori di crescita, alle stesse condizioni riportate prima. Successivamente, i propaguli sono stati sottoposti alla procedura di incapsulamento, consistente nell'immersione nella soluzione di alginato di sodio (media viscosità, Sigma codice A- 2033) (2,5 % w/v), arricchito con endosperma artificiale, composto dal mezzo R5 (Al - Bahrany, 2002) a metà concentrazione integrato con 50 g l⁻¹ di saccarosio. Poi, le microtalee rivestite di alginato state complessate per 35 min in una miscela di CaCl₂ (1,1 % w/v) contenente i componenti dell'endosperma artificiale. Le capsule di alginato indurite sono state lavate per tre volte, per 15 minuti ciascuno, nella soluzione sterile dell'endosperma artificiale (Micheli e Standardi, 2005; Germanà *et al.*, 2011), prima della semina su mezzo R5 senza regolatori di crescita (R5HF).

L'influenza del tipo auxina e la sua concentrazione è stata valutata testando l'aggiunta all'endosperma artificiale di tre auxine: l'acido indol-butyrico (IBA), l'acido indol-acetico (IAA) e l'acido α-naftalenacetico (NAA). In particolare, sono state confrontate cinque tesi:

- 1) 10 mg l⁻¹ di IBA (**T1**),
- 2) 10 mg l⁻¹ di IAA (**T2**),
- 3) 10 mg l⁻¹ di NAA (**T3**),
- 4) 5 mg l⁻¹ di IBA (**T4**),
- 5) senza auxine (**C**).

Per ogni singolo barattolo da 200 ml, contenente 50 ml di substrato di semina sopra descritto, trattamento, 5 microtalee incapsulate sono state seminate. Per ogni tesi sono stati preparati 10 barattoli. Sono state coltivate un totale di 250 capsule. Le colture sono state poi incubate in una camera di crescita a 23 ± 1 °C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e una densità di flusso di fotoni di 35 mmol m⁻² s⁻¹. Le colture sono state monitorate ogni settimana per osservare la

vitalità dei propaguli, la ripresa e la conversione. I dati, raccolti dopo 45 giorni, hanno riguardato i seguenti parametri: vitalità (espunti con aspetto verde senza necrosi o ingiallimenti), la ripresa (microtalee incapsulate che hanno prodotto germogli più lunghi di 4 mm), la conversione (estrazione simultanea dalle microtalee incapsulate di germogli e radici più lunghe di 4 millimetri), il numero di germogli (n°), la lunghezza dei germogli (cm), il numero di radici (n°) e la lunghezza delle radici (cm). L'analisi della varianza ad una via (ANOVA) è stata utilizzata per analizzare le differenze tra le medie delle diverse tesi, per ciascun parametro.

5.3 Risultati e discussione

Durante la coltura, quasi tutte le microtalee incapsulate hanno mantenuto il loro colore verde ed il loro turgore (Fig. 1-a). Dopo 10 giorni di coltura, le gemme hanno iniziato a germogliare (Fig. 1-b) ed i germogli hanno mostrato una crescita soddisfacente (Fig. 1-c). Le prime radici sono comparse dopo due settimane di coltura, crescendo in lunghezza e numero (Fig. 1-d). I risultati dell'analisi statistica sono riportati nella tabella 1. Alla fine dell'esperimento, nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per i parametri vitalità, ripresa, conversione, numero di germogli, lunghezza dei germogli, numero di radici per espunto e lunghezza delle radici per espunto, anche se, i risultati riportati nella tabella 1 sembrano interessanti. Infatti, gli elevati livelli di vitalità (94-100%) e ripresa (84-96%), confermano che anche il C35, oltre al citrange Carrizo (Germanà *et al.*, 2011), risponde bene all'incapsulamento e che la matrice di alginato non limita l'emergenza del germoglio, uno sporadico problema meccanico, riportato da Rai *et al.* (2009). Il tasso di conversione è stato piuttosto alto (22% in assenza di auxina e il 18% in presenza di NAA aggiunto all'endosperma artificiale) e superiore a quello riportato in precedenti ricerche (Germanà *et al.*, 2011, Chiancone *et al.*, 2012). Inoltre, l'aggiunta all'endosperma artificiale di 10 mg l⁻¹ di IBA ha indotto la formazione di radici moderatamente lunghe (3,5 cm) rispetto agli altri trattamenti. In questa ricerca, si conferma quanto riportato da Sharma *et al.*, (2009), che l'IBA ha un'alta efficacia sulla qualità di radicamento dei portinnesti di agrumi.

5.4 Conclusioni

Questo studio dimostra l'efficienza della tecnologia seme sintetico anche per la propagazione *in vitro* di citrange C35. Ulteriori studi sono tuttavia necessari al fine di migliorare il tasso di conversione dei semi sintetici.

In particolare, l'uso di una diversa fonte di carbonio e di altri tipi di auxine e concentrazioni potrebbero essere interessanti per migliorare la conversione dei semi sintetici di agrumi per un utilizzo innovativo nell'attività vivaistica.

Tabelle

Tabella 1 Effetti di diversi tipi e concentrazioni di auxine sui parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni in coltura.

TESI	VITALITA'		RIPRESA		CONVERSIONE		GERMOGLI		L GERMOGLI		RADICI		L RADICI	
	%	±SE	%	±SE	%	±SE	n°	±SE	cm	±SE	n°	±SE	cm	±SE
T1	94,0	3,1	90,0	3,3	8,0	3,3	1,2	0,2	1,6	0,2	1,0	0,0	3,5	1,4
T2	100,0	0,0	96,0	2,7	10,0	4,5	1,3	0,1	1,4	0,2	1,6	0,4	2,2	0,8
T3	98,0	2,0	84,0	5,0	18,0	4,7	1,2	0,1	1,5	0,2	1,6	0,3	2,7	0,5
T4	100,0	0,0	88,0	4,4	16,0	5,0	1,2	0,1	1,1	0,1	1,0	0,0	2,5	0,6
C	100,0	0,0	94,0	3,1	22,0	6,3	1,2	0,1	1,4	0,2	1,2	0,2	2,2	0,5

I dati sono riportati come media ± errore standard (SE).

T1: 10 mg l⁻¹ IBA;

T2: 10 mg l⁻¹ IAA;

T3: 10 mg l⁻¹ NAA;

T4: 5 mg l⁻¹ IBA;

C: assenza auxine

Figure

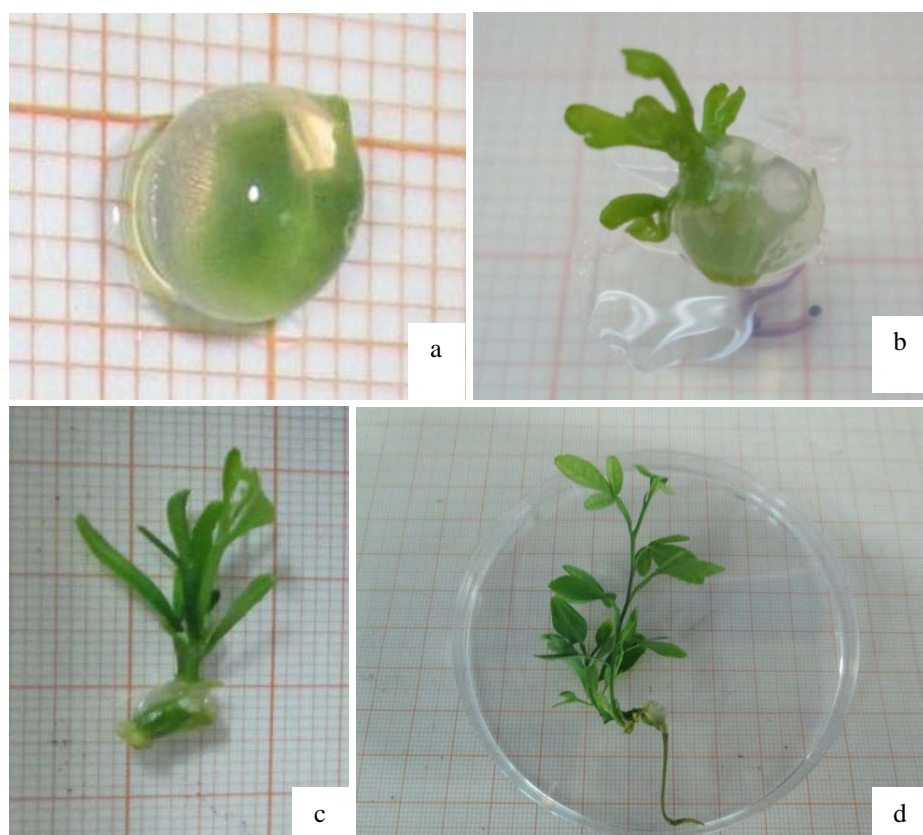


Figura 1 – a) Microtalea incapsulata di citrange C35; b) Ripresa di una microtalea incapsulata di citrange C35 c) Allungamento del germoglio da una capsula di citrange C35 d) Piantina vigorosa sviluppata da seme sintetico di citrange C35

6. STUDIO SULL'INCAPSULAMENTO DI MICROTALIEE VITRO-DERIVATE DI UN GENOTIPO SICILIANO DI GELSO (*Morus nigra* L.)

6.1 Introduzione

Il gelso appartiene al genere *Morus* afferente alla famiglia delle *Moraceae*, che comprende molte specie. Esso è originario della regione Indo-Cinese ed è ampiamente distribuito nella bassa regione sub-himalayana fino ad un'altitudine di 2100 m s.l.m., coprendo sia le regioni temperate che sub-tropicali dell'emisfero settentrionale. Le foglie di alcune specie di questo genere sono utilizzate come cibo per i bachi da seta. *Morus alba* e *Morus indica* producono frutti commestibili (Kamareddi, 2008). Le foglie di *Morus alba* hanno proprietà antiossidanti per la presenza di α -tocoferolo e β -carotene (Yen *et al.*, 1996) ed attività ipoglicemizzante delle foglie è stata riscontrata in *Morus indica* (Kelkar *et al.*, 1996).

La propagazione del gelso avviene, di solito, per talea o per innesto. Poiché alcune cultivar presentano difficoltà nella radicazione, non sempre questi metodi possono essere applicati (Rai *et al.*, 2009). Per tale motivo, la micropropagazione e la tecnologia dell'incapsulamento potrebbero essere un valido strumento, in termini di efficienza e redditività, per la sua propagazione clonale in tempi rapidi (Kavyashree *et al.*, 2006). Fino ad oggi, diverse sono le specie frutticole oggetto di ricerche sull'incapsulamento, tra cui l'actinidia (Gardi *et al.*, 1999), il melo (Micheli *et al.*, 2002), gli agrumi (Germanà *et al.*, 1999), l'olivo (Micheli e Standardi, 2005), il banano (Ganapathi *et al.*, 2001; Suprasanna *et al.*, 2001), la vite (Wang *et al.*, 2002, 2004; Das *et al.*, 2006), il mango (Wu *et al.*, 2003) e il melograno (Naik e Chand, 2006). Nel caso del gelso, le ricerche relative all'incapsulamento di propaguli unipolari (microtalee) sono ancora limitate (Bapat *et al.*, 1987; Pattnaik e Chand, 2000; Chiancone *et al.*, 2009).

L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'effetto di diverse combinazioni dei regolatori di crescita, in particolare l'acido indol-3-butirrico (IBA) e la 6-benzilaminopurina (BAP), sulla conversione di microtalee incapsulate di "Fontanarossa Nera", un genotipo siciliano di gelso.

In questo studio è stato preso in esame il genotipo di gelso 'Fontanarossa nera', un'accessione siciliana di *Morus nigra* (L.). Si tratta di una pianta di più di 80 anni di età presente in provincia di Palermo. E' una pianta che si differenzia per il portamento, per l'espansione della chioma, nonché per la dimensione delle foglie.

6.2 Materiali e metodi

Materiale vegetale

Dai germogli proliferati *in vitro* di “Fontanarossa Nera” sono state prelevate microtalee (propaguli uninodali) di 3-4 mm di lunghezza, private delle foglie e dotate di gemme ascellari. Per l’incapsulamento è stato seguito il protocollo di Micheli e Standardi (2005) utilizzando un endosperma artificiale composto da metà concentrazione di sali minerali e di vitamine MS (Murashige and Skoog, 1962), con 50 g/l di saccarosio. Le capsule sono state seminate in scatole Petri contenenti 15 ml di substrato di crescita (sali minerali e vitamine MS, 30 g/l di saccarosio, 8,5 g/l Agar, pH 5,8). Sono state provate tre tesi in cui sia l’endosperma artificiale che il substrato di semina contenevano gli stessi regolatori di crescita. In particolare, le combinazioni di regolatori di crescita provate sono state le seguenti:

M1: 1,5 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP;

M2: 1,0 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP;

M3: 1,0 mg/l di IBA (Kamareddi, 2008).

Per ciascuna tesi sono state preparate 50 microtalee incapsulate (5 per scatola Petri) (Fig. 1-a). Le colture sono state incubate in una camera di crescita a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con 16 ore di luce e 8 di buio ed una densità di flusso fotonico fotosintetico di $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I dati sono stati rilevati per 45 giorni a partire dalla semina e con cadenza settimanale. In particolare sono stati registrati: la vitalità (espianti di aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti), la ripresa vegetativa (microtalee incapsulate che producono germogli > 4 mm) e la conversione (emergenza di germogli e radici lunghi almeno 4 mm, dalle microtalee incapsulate). Inoltre, sono stati registrati il numero di germogli per espianto, il numero di radici per espianto radicato, la lunghezza dei germogli e la lunghezza delle radici.

I dati sono stati elaborati ricorrendo all’ANOVA a una via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ($p \leq 0,05$).

6.3 Risultati e discussioni

Le microtalee di “Fontanarossa Nera”, come già riportato in studi precedenti (Chiancone *et al.*, 2009), hanno risposto in maniera positiva all’incapsulamento. Infatti, esse hanno mantenuto il colore verde e un buon turgore dei tessuti, anche se la vitalità è passata dal 100% della prima settimana al 64-84% della sesta settimana. La ripresa vegetativa (Fig. 1 b-c), iniziata già alla prima settimana, ha raggiunto, dopo 45 giorni dalla semina, valori tra il 64% (M1) e l’84% (M2). Il numero più alto (2,3) di germogli per microtalea germogliata, è stato osservato sul mezzo M2.

L'emissione di radici è cominciata già durante la prima settimana nelle microtalee incapsulate e seminate su mezzo M2. La conversione più alta è stata ottenuta con il mezzo M2 (6%) ed è risultata piuttosto bassa (Tab. 1) (Fig. 1-d).

L'analisi effettuata sui dati rilevati alla sesta settimana non ha mostrato differenze statisticamente significative per i parametri vitalità e ripresa. Per quanto riguarda la conversione, invece, essa è risultata statisticamente superiore per le capsule poste in coltura su mezzo M2 (Tab. 1).

Come riportato in studi precedenti (Chiancone *et al.*, 2009), la risposta alla coltura in vitro, è altamente genotipo-dipendente; infatti, il mezzo di coltura M3 che in altri genotipi aveva indotto un'elevata rizogenesi (Kamareddi, 2008), su "Fontanarossa Nera" non ha dato risultati altrettanto positivi. In questo studio, i migliori risultati per tutti i parametri vegetativi considerati, sono stati ottenuti da microtalee incapsulate poste in coltura su mezzo contenente sia l'IBA che il BAP.

6.4 Conclusioni

Dal presente studio risulta che la tecnologia dell'incapsulamento può risultare uno strumento valido da applicare al germoplasma del gelso, anche se il protocollo adottato deve essere oggetto di perfezionamento ed ottimizzazione. Ulteriori studi saranno effettuati al fine di conseguire valori più elevati di conversione delle microtalee incapsulate.

Tabelle

Tabella 1- Influenza del mezzo colturale su alcuni parametri vegetativi delle microtalee incapsulate, dopo 45 giorni di coltura.

MEZZO	VITALITÀ (%)	RIPRESA (%)	GERMOGLI/ ESPIANTO GERMOGLIATO (N°)	LUNGH. GERMOGLI (CM)	CONVERSIONE (%)	RADICI/ ESPIANTO RADICATO (N°)	LUNGH. RADICI (CM)
M1	66,0	64,0	1,4 b	1,0	0,0 c	0,0	0,0
M2	84,0 ns	84,0 ns	2,3 a	0,9 ns	6,0 a	1,0	0,3
M3	64,0	64,0	1,0 b	1,4	2,0 b	5,0	1,0

All'interno di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per $p < 0,05$ (ANOVA a una via, test di Tukey, $p < 0,05$)

M1: 1,5 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP;

M2: 1,0 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP;

M3: 1,0 mg/l di IBA (Kamareddi, 2008).

Figure

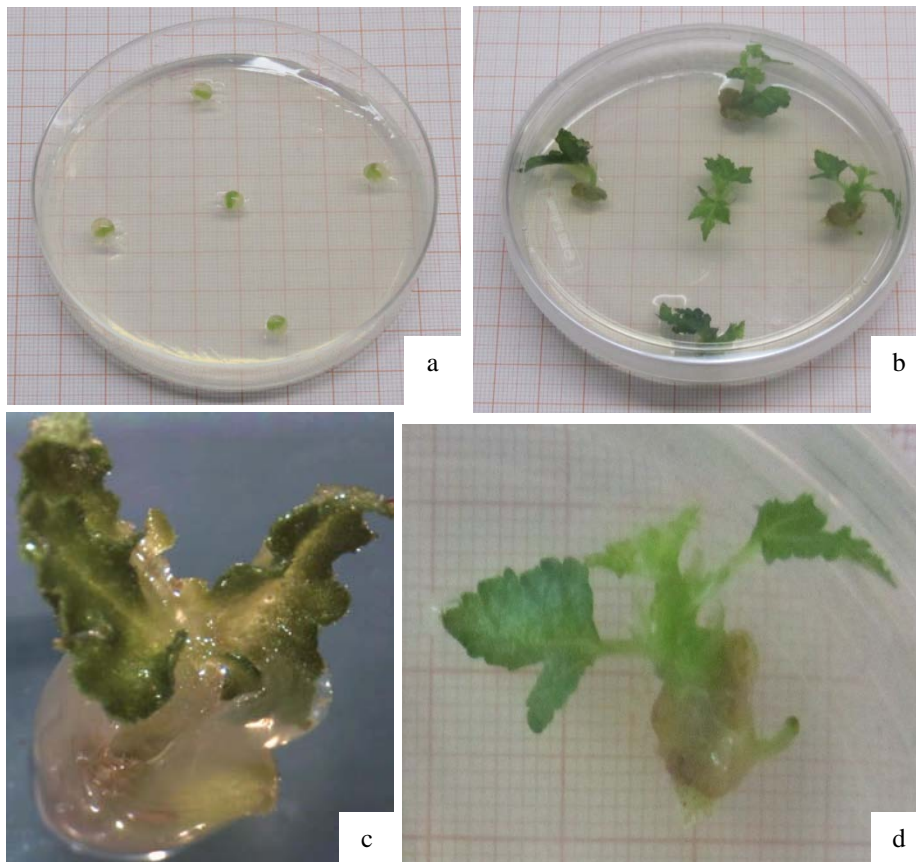


Figura 1 – a) Capsule di gelso in coltura; b) Microtalee incapsulate di gelso germogliate *in vitro*; c) Ripresa vegetativa in microtalee di gelso incapsulate; d) Conversione di microtalea di gelso incapsulata

7. Considerazioni conclusive in merito al progetto di ricerca svolto

Alla luce dei risultati ottenuti durante i tre anni di dottorato, si può affermare l'efficacia della tecnologia dell'incapsulamento di propaguli unipolari in capsule di alginato di calcio, come strumento biotecnologico a servizio della micropropagazione. In merito all'incapsulamento di propaguli *vitro*-derivati di citrange Carrizo e C35 si è constatata l'influenza positiva del pretrattamento a freddo delle microtalee e del trattamento rizogeno induttivo delle capsule. In particolare, per il citrange C35, i migliori risultati sono stati ottenuti, in termini di conversione, in assenza di auxine nell'endosperma artificiale a conferma della risposta genotipo-dipendente degli espianti incapsulati.

Lo studio sull'incapsulamento di microtalee di un genotipo siciliano di gelso nero (*Morus nigra* L.) "Fontanarossa Nera" ha confermato l'idoneità di tale strumento biotecnologico anche per tale specie, sebbene studi ulteriori dovranno essere effettuati al fine di conseguire valori più elevati di conversione dei propaguli.

La biotizzazione applicata alla tecnologia dell'incapsulamento si è mostrata una tecnica promettente che potrà essere di grande aiuto in un futuro prossimo per la propagazione massiva delle piante arboree da frutto, se opportunamente affinata e perfezionata. In particolare, l'aggiunta all'endosperma artificiale di una sospensione di inoculo batterico (PGPB) in microtalee incapsulate di citrange Carrizo ha fornito valori di conversioni prossimi a quelli ottenuti per lo stesso genotipo col pretrattamento a freddo delle microtalee seguito dal trattamento rizogeno induttivo.

L'utilizzo degli AMF in fase di *ex-vitro* in piantine *vitro*-derivate di citrange Carrizo ha fornito piantine più vigorose e con un apparato radicale più sviluppato specialmente su substrato sterile, a conferma di quanto riportato in letteratura.

Fondamentale sarà il superamento delle difficoltà in merito all'applicazione *in vitro* di tali microrganismi, data la suscettibilità dell'inoculo a contaminazioni di varia natura, attraverso il miglioramento delle tecniche di sterilizzazione (Eskandari e Danesh, 2010).

L'obiettivo cardine della ricerca resta comunque l'impiego dei semi sintetici nel settore vivaistico al fine di operare la semina in condizioni di *ex vitro*, su substrati diversi dal mezzo agarizzato, per consentire la produzione massale di materiale sano e certificato in ambienti non sterili come le strutture vivaistiche (Germanà *et al.*, 2010).

8. Bibliografia

- AA.VV., (1991). Frutticoltura speciale. Reda.
- ABOTT L. K., ROBSON A. D., (1986). "The effect of VA mycorrhizae on plant growth" in VA Mycorrhiza, C. L. Powell e D. J. Bagyaraj Eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 113-130.
- ADE G., MUSACCHI S., (2003). La meccanizzazione delle operazioni colturali nei cicli di produzione vivaistica dei fruttiferi e della fragola. Frutticoltura, 1, 3-21.
- ADRIANI M., PICCIONI E., STANDARDI A., (2000). Effects of different treatments on the conversion of "Hayward" kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of *vitro*-derived buds. New Journal of Crops and Horticultural Sciences 29:59-67.
- AGUGLIA L., CARRILLO F., MADAU F. A., PERITO M. A., (2008). La commercializzazione degli agrumi freschi e trasformati. Quaderno n°3, Inea.
- AKHTAR N., (1997). Studies on induction of somatic embryogenesis and production of artificial seeds for micropropagation of a tropical fruit tree guava (*Psidium guajava* L.). Ph.D. Banaras Hindu University, Varanasi, India.
- ARIF M, IBRAHIM M, AHMAD A, HASSAN S, (2005). Elimination of citrus tristeza closterovirus from citrus bud-wood through thermotherapy. Pak J Bot 37: 423-430.
- ANVARI F., EBRAHIMI Y., ALIAN Y.M., (1991). The effect of collection time on root development on kiwifruit hardwood cuttings in Northern Iran. Acta Horticulturae, 297: 193-196.
- AQUEA F., POUPIN M.J., MATUS J.T., GEBAUER M., MEDINA C., ARCE-JOHNSON P., (2008). Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. Biotechnological Letters 30:1847-1852.
- ARA H., JAISWAL U., JAISWAL V.S., (2000). Synthetic seed: prospects and limitations. Current Science 78:1438–1444.
- ARA H., JAISWAL U., JAISWAL V.S., (1999). Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryo of mango (*Mangifera indica* L.). Plant Cell Report 19:166–170.
- ASLANTAS, R., CAKMAKCI, R., SAHIN, F., (2007). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Sci. Hortic. 111, 371–377.
- AUTORE SCONOSCIUTO, (1940). Effects obtained with mixture of root-inducing and other substances. Contrib. Boyce Thomp. Inst. 11: 143-160.
- BAPAT V.A., MHATRE M., RAO P.S., (1987). Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant Cell Reports 6:393-395.
- BAPAT V.A., RAO P.S., (1988). Sandalwood plantlets from synthetic seeds. Plant Cell Report 7:434–436.

- BAREA J.M., AZCÒN-AGUILAR C., AZCÒN R., (1987). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N technique under field conditions. *NewPhytol.* 106,717-725.
- BARTOLINI G., FABBRI A., TATTINI M., (1988). Phenolic acids and rhizogenesis in cuttings of “Frangivento” olive. *Olea* 19: 73-77.
- BASHAN Y., DE-BASHAN L.E., (2005). Bacteria. *Encyclopedia of soils in the environment.* (Editor-in-Chief) D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K. Vol. 1., pp. 103-115.
- BHAU S., WAKHULU A. K., (2001). Effect of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in *Morus alba* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 66: 25-29.
- BHAU S., WAKHULU A. K., (2003). Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. *Biologia Plantarum* 46 (3): 349-355.
- BOURGIN J.P., NITSCH J.P., (1967). Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* 9: 377-382.
- BROWN L., ROSNER B., WILLETT W.W., SACKS F.M., (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 30–42.
- CALABRESE F. (1998). *La Favolosa Storia degli Agrumi.* L'Epos Società Editrice, Palermo.
- CALAVAN E.C., ROISTACHER C.N., NAUER E.M., (1972). Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Dis. Repr.*, 56, 976-980.
- CAMERON J.W. E SOOST R.K., (1986). C35 and C32: citrange rootstock for citrus. *HortScience* Vol 21 (1): 157-158.
- CAMPRUBÌ A., (1994). *Micorrizas en viveros de cítricos: selecció de hongos y aplicació de asta biotecnología en un sistema de producció en campo.* PhD., Facultad de Biología. Univ. de Barcelona, Spain.
- CANGAHUALA-INOCENTE G.C., DAL VESCO L.L., STEINMACHER D., TORRES A.C., GUERRA M.P., (2007). Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. *Scientia Horticulturae* 111: 228-234.
- CAPUANO G., PICCIONI E., STANDARDI A., (1998). Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* 73:299–305.
- CARLSON W.C., HARTLE J.E., (1995). Manufactured seeds of woody plants. In: Jain SM, Gupta RK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 1 History, molecular and biochemical aspects and applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- CARTES P.R., CASTELLANOS H.B., RIOS D.L., SAEZ K.C., SPIERCCOLLI S.H., SANCHEZ M.O., (2009). Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech (*Nothofagus alpina* (Poepp. e Endl.) Oerst.). Chilean Journal of Agricultural Research 69 (1): 112-118 (JANUARY-MARCH 2009).
- CARUSO A., SAVINO V., DAVINO M., (2003). La tristezza in Italia. Atti convegno su “Ricerche e sperimentazione nel settore dell’agrumicoltura”, Acireale, 8 aprile, 329-335.
- CASSELS A.C., MARK G.L., PERIAPPURAM C., (1996). Establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in autotrophic strawberry cultures in vitro. Comparison with inoculation of microplants in vivo. Agronomie, 16 (1996), pp. 625–632.
- CASSIDY M., MULLINEERS H., LEE H. AND TREVORS J.T., (1997). Mineralization of pentachlorophenol in a contaminated soil by *Pseudomonas* sp UG30 cells encapsulated in k-carrageenan. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19, 43-48.
- CASTILLO B., SMITH MAL, YADAV U.L., (1998). Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Report 17:172–176.
- CATALANO L., (2003). L’innovazione nel vivaismo frutticolo. Italus Hortus - Vol. 10, supplemento al n. 4, luglio-agosto 2003.
- CATALANO L., MARTINELLI A., (2005). Il vivaismo si aggiorna fra nuove tecniche di propagazione e normative di processo. Frutticoltura, 12, 28-35.
- CATARA A., GRASSO S. E PERROTTA G., (1968). Influenza delle gibberelline nei rapporti virus-pianta ospite in virosi degli Agrumi, e tentativi di una loro utilizzazione, abbinata alla termoterapia, per ottenere materiale esente da «exocortite». Notiz. Mal. Piante, 80-81, 93-109.
- CHANG K., (1992). The evaluation of citrus demand and supply. Proc. Int. Soc. Citric., Italy, Vol. 3, 1153-1155.
- CHAPOT H., (1975). The citrus plant. In: Citrus Technical Monograph, no. 4. Ciba-Geigy Agrochemicals, pp. 6–13.
- CHIANCONE B., GERMANÀ M.A., MICHELI M., PATRICOLO G., STANDARDI A., (2009). Le potenzialità delle colture in vitro nella conservazione e diffusione di germoplasma di *Morus* spp. Atti III Convegno Nazionale delle Piante Mediterranee (Bari, 27 settembre - 1 ottobre 2006). Italian Journal of Agronomy, Vol. 4 (4):297-302 (ISSN 1125-4718).
- CODOÑER-FRANCH, P., VALLS-BELLÉS, V., (2010). Citrus as Functional foods. Curr. T. Nutraceut. Res., 8, 173–183.
- CONTINELLA G., LA ROSA G., (1986). Comportamento bio-agronomico dell’arancio Moro su otto portinnesti. Atti convegno su “Il recente contributo della ricerca allo sviluppo dell’agrumicoltura italiana”, Cagliari 29 aprile – 3 maggio, 147-155.

- COOPER K.M., (1984). Physiology of VA mycorrhizal associations. In: Powell CC, Bagyaraj DJ, eds. VA Mycorrhiza. Boca Raton, Fla: CRC Press, 155-186.
- COOPER, K. E GRANDISON, G.S., (1986). Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. *Annals of Applied Biology* 108, 555–565.
- CRESCIMANNO F.G., DE PASQUALE F., TUSA N., (1986). Osservazioni preliminari sul clone nucellare di “Brasiliano 92” e sulla selezione “Ugudlena 6” innestati su diversi portinnesti. Atti convegno su “Il recente contributo della ricerca allo sviluppo dell’agrumicoltura italiana”, Cagliari 29 aprile – 3 maggio, 147-155.
- DEBERGH, P.C., MAENE L.J., (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Vol. 14, (4): 335-345.
- DESJARDINS, P.R., WALLACE J.M., LANGE C.T., DRAKE R.J., (1957). The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. *Pl. Dis. Repr.*, 41: 230-31.
- D.J.HUTCHISON, (1974). Swingle Citrumelo-A promising rootstock hybrid. *FLORIDA STATE HORTICULTURAL SOCIETY*, 1974 pp. 89-91.
- D’ONGHIA A.M., IPPOLITO A., VOVLAS N., SAVINO V., (2001). Punti critici degli agrumi. Progetto POM A32-Risultati di due anni di attività-Termoli (CB), 1 e 2 Marzo 2001.
- DAS D.K., NIRALA N.K., REDDY M.K., SOPORY S.K., UPADHYAYA K.C., (2006). Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage and propagation of pathogen free plant material. *Vitis* 45:179–184.
- DAVIS F.S., ALBRIGO L.G., (1994). Citrus. In: *Crop Production Science in Horticulture Series*, pp.134-135. CAB International, Wallington.
- DE CARLO A., LAMBARDI M., (2005). Cryopreservation of Citrus Germoplasm. The Role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- DE PAOLI G., ROSSI V., SCOZZOLI A., (1994). Micropropagazione delle piante ortofrutticole. Edagricole.
- DE SILVA, A., PETTERSON, K., ROTHROCK, C., MOORE, J., (2000). Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. *HortScience* 35, 1228–1230.
- DEBERGH P.C., MAENE L.J., (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.*, 14: 335-345.
- DEIDDA P., FRAU A.M., (1986). Valutazione di alcuni portinnesti per arancio dolce e pompelmo. Atti convegno su “Il recente contributo della ricerca allo sviluppo dell’agrumicoltura italiana”, Cagliari 29 aprile – 3 maggio, 147-155.

- DEL CAMPO F.J., JULIA J.F., (2002). *Lecturas de economia citrícola*, Universidad Miguel Hernandez, Spagna.
- DELANGE, J.H., (1978). Shoot-tip grafting, A modified procedure. *Citrus and Subtropical Fruits Journal*, 539: 13-15.
- DEY R., PAL K.K., BHATT D.M., CHAUHAN S.M., (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159, 371–394.
- DIKEMAN C.L., FAHEY G.C., (2006). Viscosity as related to dietary fiber: A review. *Crit. Rev. Food Sci.*, 46, 649–663.
- DOBBELEARE S., CROONENBORGH S., THYS A., PTACEK D., OKON Y., VANDERLEYDEN J., (2002). Effects of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils* 36, 284–297.
- DUVICK D.N., (1978). Risks of monoculture via clonal propagation. In *Propagation of higher plants through tissue culture; A bridge between research and application*, K.W. Hughes et al., eds. U.S. Dept. of Energy, Tech. Information Center, pp. 73-84.
- ECONOMOS C.; CLAY W., (2012). Nutritional and health benefits of citrus fruits. Food and Agriculture Organization. Available online: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/X2650T/X2650t03.pdf> (accessed on 1 October 2012).
- ESITKEN A., KARLIDAG H., ERCISLI S., SAHIN F., (2002). Effects of foliar application of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 117(3):302–305.
- ESITKEN A., KARLIDAG H., ERCISLI S., TURAN M., SAHIN F., (2003). The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu). *Aust. J. Agric. Res.* 54, 377–380.
- ESITKEN A., PIRLAK L., TURAN M., SAHIN F., (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Sci. Hortic.* 110, 324–327.
- ESKANDARI A., DANESH Y.R., (2010). Study of life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using in vitro culturing technique. *J. Phytol.* 2, 69e75.
- ESTRADA-LUNA A.A., DAVIES F.T., (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscissic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *J. Plant Physiol.* 160, 1073–1083.

- FAO (2011). FAOSTAT, 2011. <http://faostat.fao.org/>
- FENICE M., SELBMAN L., FEDERICI F., VASSILEV N., (2000). Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. *Biores. Technol.*, 73 (2000), pp. 157–162.
- FIDEGHELLI C.; STRADA G. DELLA; LIVERANI A.; MINGUZZI A., (1986). Introduzione di Venus e Romea, due nuove cultivar per la peschicoltura italiana. *Annali-dell'Istituto-Sperimentale-per-la-Frutticoltura,-Roma (Italy)*. (1986). v. 17 p. 137-144.
- FILATOVA I.A., KOLESNOVA Y., (1999). The significance of flavonoids from citrus juice in disease prevention. *Pishcheviaya Promyshlennost* 8, 62-63.
- FORNER-GINER M.A., ALCAIDE E., PRIMO-MILLO, J.B. FORNER. A., (2003). Performance of ‘Navelina’ orange on 14 rootstocks in northern Valencia (Spain). *Scientia Hort.* 98:223–232.
- FRANGI P., COLOMBO A., TOSCA A., POZZI A., VALAGUSSA M., (2006). Gestione di un vivaio a ciclo chiuso per la coltivazione di piante in contenitore. *Informatore Fitopatologico*, 7/8, 35-41.
- GARDI T., PICCIONI E., STANDARDI A., (1999). Effect of bead nutrient composition on regrowth ability of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species. *Journal of Microencapsulation* 16(1):13-25.
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID D.W., THORPE T., (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plants*, 32: 272-289.
- GEORGE E.F., (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology*. Exegetics Ltd., Edington.
- GEORGE E., HÄUSSLER K., VETTERLEIN D., GORGUS E MARSCHNER H., (1992). Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae* Can. J. Bot. 70, 2130–2137.
- GERDEMANN J. W., (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6:397-418.
- GERMANÀ M.A., HAFIZ A.I., MICHELI M., STANDARDI A., (2007). Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 88:117–120.
- GERMANÀ M.A., (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2006) 86:131–146
- GERMANA` M.A. E CHIANCONE B., (2003). Improvement of the anther culture protocol in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell Rep.* 22: 181–187.
- GERMANÀ M.A., PICCIONI E., STANDARDI A., (1999). Effect of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco, somatic embryo conversion. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 55:235–237.

- GERMANÀ M.A., MICHELI M., CHIANCONE B., MACALUSO L., STANDARDI A., (2011). Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. Plant Cell Tissue And Organ Culture.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., STANDARDI A., (2010). Il seme sintetico: nuova tecnologia per il settore vivaistico specializzato?. Rivista di Frutticoltura, anno LXXII, n° 12, 2010.
- GERMANÀ M.A. E REFORGIATO G., (1997). Haploid embryos regeneration from anther culture of 'Mapo' tangelo (*Citrus deliciosa* x *C. paradisi*). Advan. Hort. Sci. 11: 147–152.
- GHUGALE D. D., KULKARNI D., NARSIMHAN R., (1971). Clonal propagation of *Morus alba*. Indian J. exp. Biol., 9: 381-384.
- GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., (1983). The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. Plant and Soil 71, 197-209.
- GMITTER F.G., JR., XIAO S.Y., HUANG S., HU X.L., GARNSEY S.M., DENG Z. (1996). A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. Theor Appl Genet 92:688-695.
- GRIBAUDO I., GAMBINO G., (2010). L'embriogenesi somatica: un valido strumento di risanamento da virus in vite. Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI). Gruppo di Lavoro Micropropagazione e tecnologie in vitro. Newsletter n°3-Luglio 2010, pp. 2-3.
- GRONDEAU C., SAMSON R. A., (1994). Review of thermotherapy to free plant materials from pathogens especially seed from bacteria. Critical Reviews in Plant Sciences, 13, 57-75.
- GROSSER J.W., CHANDLER J.L., (2000). Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for citrus rootstock improvement. J. Hortic. Sci. Biotech. 75: 641–644.
- GROSSER J.W., GMITTER F.G. JR., CASTLE W.S., CHANDLER J.L., (1995). Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: progress report. Proc. Fla. State Hort. Soc., 108: 140-143.
- GROSSER J.W., GMITTER F.G. JR., TUSA N. E CHANDLER J.L., (1990). Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. Plant Cell Rep. 8: 656–659.
- GUHA S., MAHESHWARI S.C., (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. Nature 212: 97-98.
- GUR A., GAD A.E., HAAS E., (1988). Rooting of apple rootstock clones as related to phenols and their oxidation. Acta horticulturae 227: 160-166.
- HABERLANDT G., (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. Math Naturwiss 111:69–92.
- HANNING E., (1904). Uber die kultur von Cruciferne, Embryonen ausenhalb des Embryosachs. Bot. Ztg. 62: 45–80.

- HARLEY J. L., SMITH S. E., (1983). "Mycorrhizal Symbiosis", Academy press London, 1-483.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., (1990). Propagazione delle piante. Basi scientifiche e applicazioni tecniche. Edizioni Agricole.
- HERNÁNDEZ-DORREGO A., 2002. Micorrizas arbusculares en el marco de la producción ecológica e integrada. Phytoma España 135, 27-29. [In Spanish].
- HORST R.K., KLOPMAYER M.J., (1993). Controlling virus diseases. In: White JW (ed) Geraniums IV (pp 286–292). Ball Publishing Co., IL.
- HOSSAIN M., RAHAMN S.M., ZAMAN A., JOARDER O.J., ISLAM R., (1992). Micropropagation of *Morus leavigata* Wall. from mature trees. Plant. Cell. Rep., 11: 522-524.
- HU C.Y., WANG P.J., (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. D.F. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada, (eds), pp. 177-227. Macmillan Publishing, New York.
- ISTAT (2012). Dati annuali sulle coltivazioni. Agricoltura e zootecnia. http://agri.istat.it/sag_is_pdwout/jsp/dawinci.
- IVANICKA J., (1987). In vitro micropropagation of mulberry *Morus nigra* L. Scientia Hort., 32: 33-40.
- JACOBSEN I., ABBOTT L.K., ROBSON A.D., (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. 2. Hyphal uptake of ^{32}P at defined distances from roots. New Phytologist Volume 120, Issue 3, Article first published online: 28 APR 2006.
- JAIN A. K., DANDIN S. B., SENGUPTA K., (1990). In vitro propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant. Cell. Rep., 8: 737-740.
- JAIN A. K., DATTA R. K., 1992. Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koiz.): factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult., 29: 43-50.
- JAIN A.K., SARKAR A., DATTA R.K., (1996). Induction of haploid callus and embryogenesis in in vitro cultured anthers of Mulberry (*Morus indica*). Plant Cell Tissue Organ Cult 44: 143-147.
- KAMAREDDI S., (2008). Development of synthetic seed in Mulberry (*Morus indica* L.) cv. M-5 and evaluation under controlled conditions. Department of Agronomy College of Agriculture, Dharwad. University of Agricultural Sciences, Dharwad-580 005.
- KARLIDAG H., ESITKEN A., TURAN M., ŞAHİN F., (2007). Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Sci. Hort. 114, 16–20.

- KATASE M., (1993). Factors effecting proliferation of shoot in mulberry axillary bud culture. J. Sericult. Sci. Jpn., 152: 161.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M.C., REVANASIDDAIAH H.M., (2006). Propagation of mulberry variety-S54 by synseeds of axillary buds. Plant Cell Tissue And Organ Culture 84:245-249.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHI A., (1995). Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Morus alba*. Israel J. Plant Sci. 43: 259-262.
- KELKAR S.M., BAPAT V.A., GANAPATHI T.R., KAKLIJ G.S., RAO P.S., HEBLE M.R., (1996). *Morus indica* L. shoot cultures: detection of hypoglycemic activity. Curr. Sci., 71:71-72.
- KIM Y.H., JANICK J., (1990). Synthetic seed technology: improving dessication tolerance of somatic embryos of celery. Acta Horticultrae 280:23-28.
- KLOEPPER, J.W., (1994). Plant growth promoting bacteria (other systems). In: Okon, J. (Ed.), Azospirillum/Plant Association. CRC Press, Boca Raton, pp. 137–154.
- KOZAI T., TING K.C., AITKEN-CHRISTIE J., (1991). Considerations for automation of micropropagation systems. Trans of the ASAE 35:503-517.
- KRISHNA H., SINGH S.K., SHARMA R.R., KHAWALE R.N., GROVER M., PATEL V.B., (2005). Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. Sci. Hortic. 106, 554–567.
- KURTZ S.L., HARTMAN R.D. E CHU I.Y., (1991). Current methods of commercial micropropagation. In: Vasil, IK (Ed) Scale-up and Automation in Plant Propagation (pp 7–35), Academic Press, New York
- LAIBACH F., (1925). Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. Z. Bot. 17:417–459.
- LAKSHMI SITA G., RAVINDRAN S., (1991). Gynogenic plants from ovary cultures of mulberry (*Morus indica*). In: J. Prakash e R.L.M. Pierik (eds.), Horticulture: New Technologies and applications, pp. 225-229. Kluwer, Dordrecht.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., (2009). Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale. Italus Hortus 16(1): 79-98.
- LINDERMAN R.G., (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. Eds. G J Bethlenfalvay and R G Linderman. pp 45–70. Am. Soc. Agron. Special Publication No. 54, Am. Soc. Agron. Madison, WI.
- LIU J., XU X., DENG X., (2005). Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2005) 82: 19–44.
- LIVERANI C., SPADA G., (1993). La propagazione del kaki. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura. v. 55(1) p.57-59.

- LORENZETTI F., SALAMINI F., (1989). Biotecnologie e innovazione in agricoltura. *Rivista di Agronomia* 23: 337-371.
- LU M., (2002). Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Scientia Horticulturae* 96: 329-341.
- LUCACCIONI L., MICHELI M., STANDARDI A., (2005). Incapsulamento di microtalee proliferate in vitro di GF677 per l'allestimento di semi sintetici. Atti del V Convegno Nazionale sulla Peschicoltura Mediterranea, Locorotondo (BA) 29-30 settembre:139-146.
- LUCY, M., REED, E., GLICK, B.R., (2004). Application of free living plant-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 1–25.
- MACGUIDWIN A.E., BIRD G.W. AND SAFIR G.R., (1985). Influence of *Glomus fasciculatum* on *Meloidogyne hapla* infecting *Allium cepa*. *J Nematol.* 17: 389–395.
- MAJUMDER P.K., HOWARD B.H., (1973). The response of M9 hardwood cuttings to various root inducing treatments. Report of East Mailing Research Station for 1972: 67-69.
- MEISTER A., (1994). Glutathione ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*, 269, 9397–9400.
- MENNONE C., VITELLI V., (2006). La produzione di materiale vivaistico agrumicolo in Basilicata. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*. v. 68(1) p. 66-69.
- MEZZETTI B., GENTILE A., (2005). Genetic transformation of fruit crops: results, applications and research. *Italus Hortus*, v. 12(4) p. 79-92.
- MHATRE M., BAPAT V.A., RAO P.S., (1985). Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). *Plant. Cell. Rep.*, 4: 78-80.
- MICHELI M., HAFIZ I.A., BAZZURRI N., STANDARDI A., (2006). Methodological development for synthetic seeds production of “Moraiolo”. Proceedings Second International Seminar on “Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin”, Marsala, Mazara del Vallo, 5 –10 november, Vol. I:155-158.
- MICHELI M., PELLEGRINO S., PICCIONI E., STANDARDI A., (2002). Effects of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion in M.26 apple rootstock. *Journal of Microencapsulation* 19(3):347-356.
- MICHELI M., GARDI T., MEONI M., PROSPERI F., SCERNA G., SISANI G., (2007). Nuove tecniche di coltura in vitro per la salvaguardia delle risorse vegetali autoctone. Proceedings 10 2nd Meeting of the Botanical Society, Palermo, 26-29 september:234.
- MILIND L., (2008). *Citrus Fruits: Biology, Technology and Evaluation*. Elsevier's Science e Technology.

- MILLER L.R., MURASHIGE T., (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. In vitro 12: 797-813.
- MILLER E.V., (1954). The natural origins of some popular varieties of fruit. Econ. Bot. 8: 337-348.
- MONTICELLI S., PUPPI G., DAMIANO C., (2000). Effects of in vivo mycorrhization on micropropagated fruit tree rootstocks. Applied Soil Ecology 15 (2000) 105–111.
- MORALDI M., LANZI P., (1993). Il riscaldamento localizzato dell'innesto nella produzione vivaistica del noce. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura. v. 55(1) p.53-56.
- MOREL G., MARTIN C., (1955). Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. C R Seances Acad Agric Fr 41:472–475
- MORINI S., ISOLERI M. (1986). Effect of IBA and NAA on rooting of Actinidia chinensis cuttings. Acta horticulturae, 179: 885-886.
- MORONE FORTUNATO I., RUTA C., CASTRIGNANÒ A., SACCARDO F., (2005). The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. Scientia Horticulturae 106: 472–483.
- MORTON J.F., (1987). Fruits of Warm Climates. Julian F Morton, Florida, USA
- MURASHIGE T., (1978). The impact of tissue culture in agriculture. In: Thorpe A (ed) Frontiers of Plant Tissue Culture. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary.
- MURASHIGE T., BITTERS W.P., RANGAN T.S., NAVER E.M., ROISTACHER C.N., HOLLIDAY P.B., (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. Hort. Science 7. 118-119.
- MURASHIGE T., SKOOG F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- NAIK S.K., CHAND P.K., (2006). Nutrient-alginate encapsulation of in vitro nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. Scientia Horticulturae 108:247–252.
- NARAYAN P., CHAKRABORTY S., RAO G. S., (1989). Regeneration of plantlets from the callus of stem segment of mature plants of *Morus alba* L. Proc. Indian. Natl. Sci. Acad. B. 55: 469-472.
- NAVARRO L., ROISTACHER C. N., MURASHIGE T., (1975). Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science Vol. 100 No. 5 pp. 471-479
- NAVARRO L., (1979). Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Bol. Serv. Plagas. 5: 127-148.

- NEMEC S., (1978). Response of six citrus rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 91, 10-14.
- NERI D., CAVALLARI M., DALMONTE C., (2003). Controllo della crescita degli astoni di pesco in vivaio. *Italus Hortus*, 10, 125-128.
- NERI D., SANSAVINI S., (2004). Attualità della potatura nella frutticoltura intensiva. *Rivista di Frutticoltura*, 1, 14-23.
- NICOLOSI E., (2007). *Citrus. Genetics, Breeding and Biotechnology*. Chapter 3, Origin and Taxonomy. Edited by I. Khan.
- O'BANNON J.H., NEMEC S., (1979). The response of *Citrus limon* seedlings to a symbiont, *Glomus etunicatus* and a pathogen, *Radopholus similis*. *J Nematol* 11:270–276.
- OHYAMA K., (1970). Tissue culture in mulberry tree. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 5: 30-34.
- OKA S., OHYAMA K., (1974). Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. I. Effect of growth substances on the development of shoots and organ formation from winter buds. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 43: 430.
- OKA S., OHYAMA K., (1975). Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. II. Effect of growth substances on the development of shoots from axillary buds. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 44: 444-450.
- OKA S., OHYAMA K., (1981). *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). *Can. J. Bot.*, 59:68-74.
- ONAY A., JEFFREE C.E., YEOMAN M.M., (1996). Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of pistachio, *Pistacia vera* L. *Plant Cell Report* 15:723–726.
- ORHAN, E., ESITKEN, A., ERCISLI, S., TURAN, M., SAHIN, F., (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111, 38–43.
- OTTEN J.J., PITZI HELFWIG J., MEYERS L.D., (2006). *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*; The National Academies Press: Washington, DC, USA.
- PADILLA, I.M.G., ENCINA, C.L., (2005). Changes in root morphology accompanying mycorrhizal alleviation of phosphorus deficiency in micropropagated *Annona cherimola*. *Mill. Plants. Sci. Horticult.* 106, 360–369.
- PALACIOS C., (2006). The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit. Rev. Food Sci.*, 46, 621–628.
- PATEL G.K., BAPAT V.A., RAO P.S., (1983). *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111: 465-468.

- PATTNAIK S. K., CHAND P. K., (1997). Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through in vitro culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. *Plant Cell Reports* 16: 503-508.
- PATTNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K., (1996). Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. *Syn. M. acidosa* Griff. C., 15: 841-845.
- PATTNAIK S., CHAND P.K., (2000). Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 177-185.
- PATTNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K., (1995). Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. *Scientia Horticulturae* 61:227-239.
- PERITO M.A. , AGOSTA I., BORSOTTO P., (2007). Le produzioni ortofrutticole in *Annuario dell'agricoltura italiana*. Volume LX – 2006, INEA, Roma, Edizioni Scientifiche Italiane.
- PFLEGER F. L., LINDERMAN R.G., (1996). “Mycorrhizae ad plant health”, APS Press, The Am. Phytopath. Soc., St. Paul, Minnesota, 1-344.
- PINTOS B., BUENO M.A., QUENCA B., MANZANERA J.A., (2008). Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth *Phytol.* (1987) 106, 717-725.
- PLENCHETTE C., FORTIN J.A., FURLAN V., (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70, 199-209.
- POPOVIC R., (1984). Rooting mature cuttings of *Actinidia chinensis*. *Arhiv za poljoprivredne nauke*, 45 (160): 501-506.
- PREECE J.E., SUTTER E.G., (1991). Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: *Micropropagation Technology and Application*. P.C. Debergh, R.H. Zimmerman, (eds) pp. 71-93. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- PREKA P., CHERUBINI S., (2001). Tecniche di innesto erbaceo per la propagazione di piante arboree da frutto. *Frutticoltura*, 5, 39-42.
- PURSEGLOVE J.W., (1968). *Tropical Crops. Dicotyledons. Volume I and II Combined*. English Language Book Society and Longmans, London.
- RAI M.K., ASTHANA P., SINGH S.K., JAISWAL V.S., JAISWAL U., (2009). The encapsulation technology in fruit plants: A review. *Biotechnology Advances* 27:671-679.
- RAI M.K., JAISWAL V.S., (2008). Synthetic seeds of guava (*Psidium guajava* L) from somatic embryos and plant regeneration. In: Arya ID, Arya Sarita (eds), *Utilization of biotechnology in plant sciences*. Dehradun, India.

- RAI M.K., JAISWAL V.S., JAISWAL U., (2008). Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae*, Vol. 117, (3), 302-305.
- RAMMING D.W., (1983). Embryo culture, p. 136-144. In: J.N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods of fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.
- READ P.E., (1988). Stock plants influence micropropagation success. *Acta Hort.* 226: 41-52.
- REDENBAUGH K., FUJII J.A.A., SLADE D., (1993). Hydrated coatings for synthetic seeds. In: Redenbaugh K (ed) *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. CRC Press Inc, Boca Raton, California.
- REDENBAUGH K., WALKER K., (1990). Role of artificial seeds in alfalfa breeding. In: Bhojwani SS (ed) *Plant tissue culture: applications and limitations*. Developments in crop science. Elsevier, Amsterdam.
- REDENBAUGH K., (1993). Introduction. In: Redenbaugh K (ed) *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. CRC Press Inc, Boca Raton, California.
- REFORGIATO RECUPERO G., RUSSO G., RECUPERO S., (2009). Horticultural evaluation of new *Citrus latipes* Hybrids as Rootstocks for Citrus. *HortScience* Vol. 44 (3): 595-598.
- REFORGIATO RECUPERO G., CONTINELLA G., (2006). I portinnesti in agrumicoltura: evoluzione e prospettive. *Frutticoltura*, LXVIII 1: 24-28.
- REFORGIATO RECUPERO G., RUSSO F., (1988). A trial of rootstocks for clementine “Comune” in Italy. *Sixth International Citrus Congress*. Middle East, 1, 61-66.
- REFORGIATO RECUPERO G., STARRANTINO A., MARTELLI S., SILETTI A., (1992). Performance of “Navelina” ISA 315. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1, 286-290.
- REFORGIATO RECUPERO G., TRIBULATO E., (2000). Recent development of citrus scions and rootstocks in Italy. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, IX Congr., 1, 66-68.
- RIEGER M., (2002). *Mark's Fruit Crops*. University of Georgia Horticulture. <http://www.uga.edu/fruit/index.html>.
- RIEGER M., (2006). Citrus fruits. In: *Introduction to fruit crops*. Basra, A. (ed.), Haworth Press, Inc. Binghamton, NY, pp. 157-178.
- ROMAY ALVAREZ C., GARDI T., STANDARDI A., (2002). Plantlets from encapsulated in vitro-derived microcuttings of kiwifruits (cv Top Star ®). *Agricoltura Mediterranea* 132:246-252.
- RONCADORI R.W., (1997). Interactions between arbuscular mycorrhizas and plant parasitic nematodes in agro-ecosystems. Pages 101–113 in A. C. Gange and V. K. Brown, editors. *Multitrophic interactions in terrestrial systems the 36th Symposium of the British Ecological Society*. Blackwell Science, Oxford, UK.

- ROSSETTI V., NAKADAIRA J.T. E ROESSING C., (1965). Experiments on heating budwood to eliminate exocortis virus. In W.C. Price (ed.), Proc. 3d Conf. Intern. Organization Citrus Virol., Univ. Florida Press., Gainesville, 268-271.
- RUSSO F.E., STARRANTINO A., (1973). Ricerche sulla tecnologia dei microinnesti nel quadro del miglioramento genetico-sanitario degli agrumi. Ann. Ist. Sper. Agrumicoltura. 6: 109-222.
- RUSSO G., REFORGIATO RECUPERO G., (2009). Citrus. Trattato di agrumicoltura. Edagricole.
- SAHOO Y., PATTNAIK S.K., CHAND P.K., (1997). Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. Scientia Hort. 69: 85-98.
- SAIPRASAD G.V.S., (2001). Artificial seeds and their applications. Resonance 6(5): 39-47.
- SANDERS F.E., TINKER B.P., (1973). Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pesticide Science, Issue Volume 4, Issue 3, pages 385–395, June 1973
- SANSAVINI S., VENTURI S., LUGLI S., (2006). Innovazioni tecniche e sviluppo del vivaismo frutticolo. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura. v. 68(12) p. 18-32.
- SCHENCK N.C., (1981). “Can mycorrhizae control root disease?”, Plant disease 3, 230-234.
- SCHUBLER A., (2002). Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 244:75–83.
- SCHUBLER A., SCHWARZOTT D., AND WALKER C., (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105:1413–1421.
- SETHI M., BOSE S., KAPUR A., RANGASWAMY N.S., (1992). Embryo differentiation in anther cultures of mulberry. Ind J Exp Biol 30: 146-148.
- SHARMA S., SHAHZAD A., TEIXEIRA DA SILVAB J.A., (2013). Synseed technology—A complete synthesis. Biotechnology Advances Vol. 31, Issue 2, Pag. 186-207.
- SHARMA K.K., THORPE T.A., (1990). In vitro propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments. Sci. Hortic., 42: 307-320.
- SIEVERDING E., (1991). Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Deutsche Gesellschaft Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn. 371 p.
- SIM B.L., LAWES G.S., (1981). Propagation of kiwifruit from stem cuttings. Gartenbauwissenschaft, 46 (2): 65-68.
- SINGH B., SHARMA S., RANI G., VIRK G.S., ZAIDI A.A., NAGPAL A., (2007). In vitro response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora). Plant Biotechnology Report 1:101–107.
- SKOOG F., (1955). Growth factors, polarity and morphogenesis. Année biol. 31, 1–11

SKOOG F., MILLER C.O., (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.

SMIT E., WOLTERS A.C., LEE H., TREVORS J.T., VAN ELSAS J.D., (1996). Interaction between a genetically marked *Pseudomonas fluorescens* strain and bacteriophage øR2f in soil: Effects of nutrients, alginate encapsulation, and the wheat rhizosphere. Microb Ecol 31:125–140.

SMITH S.E., READ D.J., (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Academic Press, London, UK.

SMITH G.S. AND KAPLAN D.T. (1988). Influence of mycorrhizal fungus, phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough lemon citrus seedlings. J. Nematol. 20, 539–544.

SMITH G.S., (1987). Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. In: Veech JA, Dickon DW (eds) Vistas on nematology. Society of Nematology, Hyattsville, Md, pp 292–300.

SMITH S.E., READ D.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.

SPIEGEL-ROY P. E GOLDSCHMIDT E.E., (1996). Biology of Citrus. Cambridge University Press.

STAINER R., (2007). L'evoluzione del vivaismo. Frutta e vite 1/2007, pp. 13-16.

STANDARDI A., PICCIONI E., (1997). Rooting induction in encapsulated buds of M.26 apple rootstock for synthetic seed. In: Altman A and Waisel Y (eds), Biology of Root Formation and Development, Plenum Publishing Company, New York.

STANDARDI A., PICCIONI E., (1998). Recent perspectives on the synthetic seed technology using nonembryogenic vitro-derived explants. International Journal of Plant Sciences 159(6):968-978.

STANDARDI A., (2009). Una nuova tecnologia vivaistica in vitro. I Georgofili: Atti della Accademia dei Georgofili, Serie VIII, Vol. 4(II):685-704.

SUDHAKAR P., CHATTOPADHYAY G.N., GANGWAR S.K., GHOSH J.K., (2000). Effect of foliar application of Azotobacter; Azospirillum and Beijerinckia on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). J. Agric. Sci. 134, 227–234.

SUEHARA K.I., KOHKETSU K., UOZUMI N., KOBAYASHI T., (1995). Efficient production of Celery embryos and plantlets released in culture of immobilized gel beads. Journal of Fermentation and Bioengineering 79(6):585-588.

SWINGLE W.T., (1943). The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: H.J. Webber e L.D. Batchelor (Eds), The Citrus Industry, pp. 129-474, vol. 1 (first edition). University of California, USA.

SWINGLE W.T., (1967). The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Batchelor, L.D. and Webber, H.J. (eds) The Citrus Industry. University of California Press, California, pp. 190–430.

- TANAKA T., (1954). Species problem in Citrus (Revisio aurantiacearum, IX). Japan Society Prom. Sci., Veno, Tokyo.
- TANAKA T., (1961). Contribution to the knowledge of *Citrus* classification. Reports Citrologia 107–114.
- TEWARY P.K., ARDHANA SHARMA, RAGHUNATH M.K., E SARKAR A., (2000). In vitro response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. Plant Growth Regulation 30: 17-21.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., (2012). Production of synseed for hybrid *Cymbidium* using Protocorm-Like Bodies. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 20(2) 2012: 135-146.
- THOMAS T.D., BHATNAGAR A.K., RAZDAN M.K., BHOJWANI S.S., (1999). A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba* L. Euphytica, 110: 169-173.
- THORPE T.A., (1978). Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In: International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, University of Calgary. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, 49-58.
- THORPE T.A., (1982). Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In “Plant Tissue Culture, 1982” (A. Fujiwara, ed.), pp. 121-124. Maruzen, Tokyo.
- TOLKOWSKY S., (1938). Hesperides: a History of the Culture and Use of Citrus Fruits. John Bale, Sons and Curnow Ltd, London.
- TREVORS J.T., VAN ELSAS J.D., LEE H., WOLTERS A.C., (1993). Survival of alginate encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. Appl Microbiol Biotechnol 39: 637±643.
- UTOMO HS, WENEFRIDA I, MECHE MM, NASH GL (2008). Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). Plant Cell Tissue Organ Culture 92:281-291.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., KLIRONOMOS J.N., URSIC M., MOUTOGLIS P., STREITWOLF-ENGEL R., BOLLER T., WIEMKEN A., AND SANDERS I.R., (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396 : 69 – 72.
- VIJAYA CHITRA D.S., PADMAJA G., (1999). Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) through in vitro culture of nodal explants. Scientia Horticulturae 80: 289-298.
- VIJAYA CHITRA D. S., PADMAJA G., (2002). Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. Scientia Horticulturae 92: 55-68.
- VIJAYA CHITRA D.S., PADMAJA G., (2005). Shoot regeneration via direct organogenesis from in vitro derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. Scientia Horticulturae 106: 593-602.

- VIJAYAN K., CHAJRABORTI S. P., ROY B. N., (1998). Regeneration of plantlets through callus culture in mulberry. *Ind. J. Plant. Physiol.* 3: 310–313.
- VITAGLIANO C., TESTOLIN R., YOUSSEF J., (1983). Osservazioni su alcuni fattori influenzanti la rizogenesi di talee legnose e semi-legnose di actinidia (*Actinidia chinensis* PL.). Atti II Incontro Frutticolo SOI sull'Actinidia. Udine 12-13 ottobre: 611-637.
- WAKHULU A.K., BHAI B.S., (2000). Tissue culture studies in mulberry. A review. *Sericologia* 41: 1-20.
- WALLACE, J.M., (1978). Virus and viruslike diseases. In: *The Citrus Industry* (Reuther, W., Calavan, E.C. and Carman, G.E., eds), pp. 67–184. Berkeley, CA: University of California, Division of Agricultural Sciences.
- WEBBER, H.J., (1967). History and development of the Citrus industry. In: Reuther, W., Batchelor, L.D. and Webber, H.J. (eds) *The Citrus Industry*, 2nd edn. University of California Press, California, pp. 1–39.
- WEIR S.C., DUPUIS S.P., PROVIDENTI M.A., LEE H., TREVORS J.T., (1995). Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Appl. Microbiol Biotechnol* 43: 946-951.
- WENT F.W. AND THIMANN K.V., (1937). *Phytohormones*, MacMiNan.
- WHITE P.R., (1934A). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9:585–600.
- WHITE P.R., (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am J Bot* 26:59–64.
- WINTERGERST E.S.; MAGGINI S.; HORNIG D.H., (2006). Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann. Nutr. Meta.*, 50, 85–94.
- WITTER L., (1996). Immobilized microbial cells. In: Baianu IC, Pessen H, Kumosinski TF, editors. *Physical chemistry of food processes*. New York: Van Nostrand Reinhold. pp 475–486.
- WU Q.S., ZOU Y.N., (2009). Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *PLANT SOIL ENVIRON.*, 55, 2009 (10): 436–442
- WU Q.S., ZOU Y.N., HE X.H., (2010A). Contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to growth, photosynthesis, root morphology and ionic balance of citrus seedlings under salt stress. *Acta Physiol. Plant* (2010) 32: 297-304.
- WU Q.S., ZOU Y.N., HE X.H., LUO P., (2011B). Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Plant Growth Regul* (2011) 65: 273-278.

- WU Q.S., ZOU Y.N., WANG G.Y., (2011). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Acclimatization of Micropropagated Citrus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42: 1825-1832.
- WU Y.J., HUNAG X.L., XIAO J.N., LI X.J., ZHOU M.D., ENGELMANN F., (2003). Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. *Cryo-Letters* 24(5):303–314.
- WU Q.S. AND XIA R.X., (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J. Plant Physiol.* 163: 417-425.
- WUTSCHER H.K., (1979). Citrus rootstocks. In: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*. AVI Publishing, Westport, CT, pp. 230±269.
- WUTSCHER H. K., (1974). Swingle citrumelo: an ultraresistant rootstock. *Citrograph* : 387-391
- YADAV U., LAL M., JAISWAL V.S., (1990). Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Sci. Hortic.*, 44: 61-67.
- YEN G.C., WU S.C., DUH P.D., (1996). Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 44:1687-1690.
- YOUNG C.C., REKHA P.D., LAI W.A., ARUN A.B., (2006). Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 95, No. 1, September 5, 2006, pp. 76-83.
- ZOHAR-PEREZ C., RITTE E., CHERNIN L., CHET I., NUSSINOVITCH A., (2002). Preservation of chitinolytic *Pantoea agglomerans* in a viable form by cellular dried alginate-based carriers. *Biotechnology Progress*, 18 (2002), pp. 1133–1140.
- ZOHARY, D., SPIEGEL-ROY P., (1975). Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* 187 (4174): 319-327.

9. Abbreviazioni

ANOVA	Analisi della Varianza
BAP	6-Benzilaminopurina
GA₃	Acido Gibberellico
IAA	Acido Indolacetico
IBA	Acido Indolbutirrico
MS	Mezzo di Murashige e Skoog (1962)
NAA	Acido α -naftalenacetico
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenossiacetico
AMF	Funghi Micorrizici Arbuscolari
PGPB	Batteri Promotori della Crescita delle Piante
PEG	Polietilene glicole
EMS	Etilmetansulfonato
dES	Dietilsolfato
NG	Nitrosoguanidina
ENU	Etilnitrosourea
MNU	Metilnitrosourea
GDO	Grande Distribuzione Organizzata
CTV	Virus della Tristezza degli Agrumi
CPsV	Psorosi
CEVd	Exocortite
CAC	Conformità Agricola Comunitaria
CAV	Centro Attività Vivaistiche
COVIFT	Consorzio dei Vivaisti Frutticoli Trentini
KSB	Consorzio Vivaisti Altoatesini
COVIP	Consorzio Vivaistico Pugliese
AF	Senza auxine

HF	Senza regolatori di crescita
PM	Mezzo di proliferazione
PM/2	Mezzo di proliferazione a metà concentrazione
RA	Radici avventizie
RLPO	Radici Lateralı Primo Ordine
RLSO	Radici Lateralı Secondo Ordine
IM	Indice di Micorrizzazione

10.Elenco delle produzioni effettuate durante il Dottorato di Ricerca

Atti di convegni nazionali

1. Chiancone B, Casales FG, Germana' MA (2012). Radicazione ed incapsulamento di talee vitro-derivate di citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] Carrizo. In: Ruffoni B., Savona M., Barberini S., Acta Italus Hortus Atti del 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Un incontro tra gli operatori del Settore e della Ricerca. Sanremo (IM).. p. 73-76, ISBN: 978-88-905628-6-0, Sanremo, 7-9 novembre, 2011.
2. Casales FG, Chiancone B, Di Lauria C, Germana' MA (2012). Studio sull'incapsulamento di microtalee vitro-derivate di un genotipo siciliano di gelso (*Morus nigra* L.). In: Ruffoni B., Savona M., Barberini S., Acta Italus Hortus Atti del 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Un incontro tra gli operatori del Settore e della Ricerca. Sanremo (IM). p. 257-260, ISBN: 978-88-905628-6-0, Sanremo, 7-9 novembre, 2011.

Atti di convegno internazionale

1. Germana' MA, Micheli M, Chiancone B, Bianco C, Casales F G, Defez R (2012). Preliminary Results on Biotization of Encapsulated Vitro-Derived Propagules of Carrizo Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. Submitted.

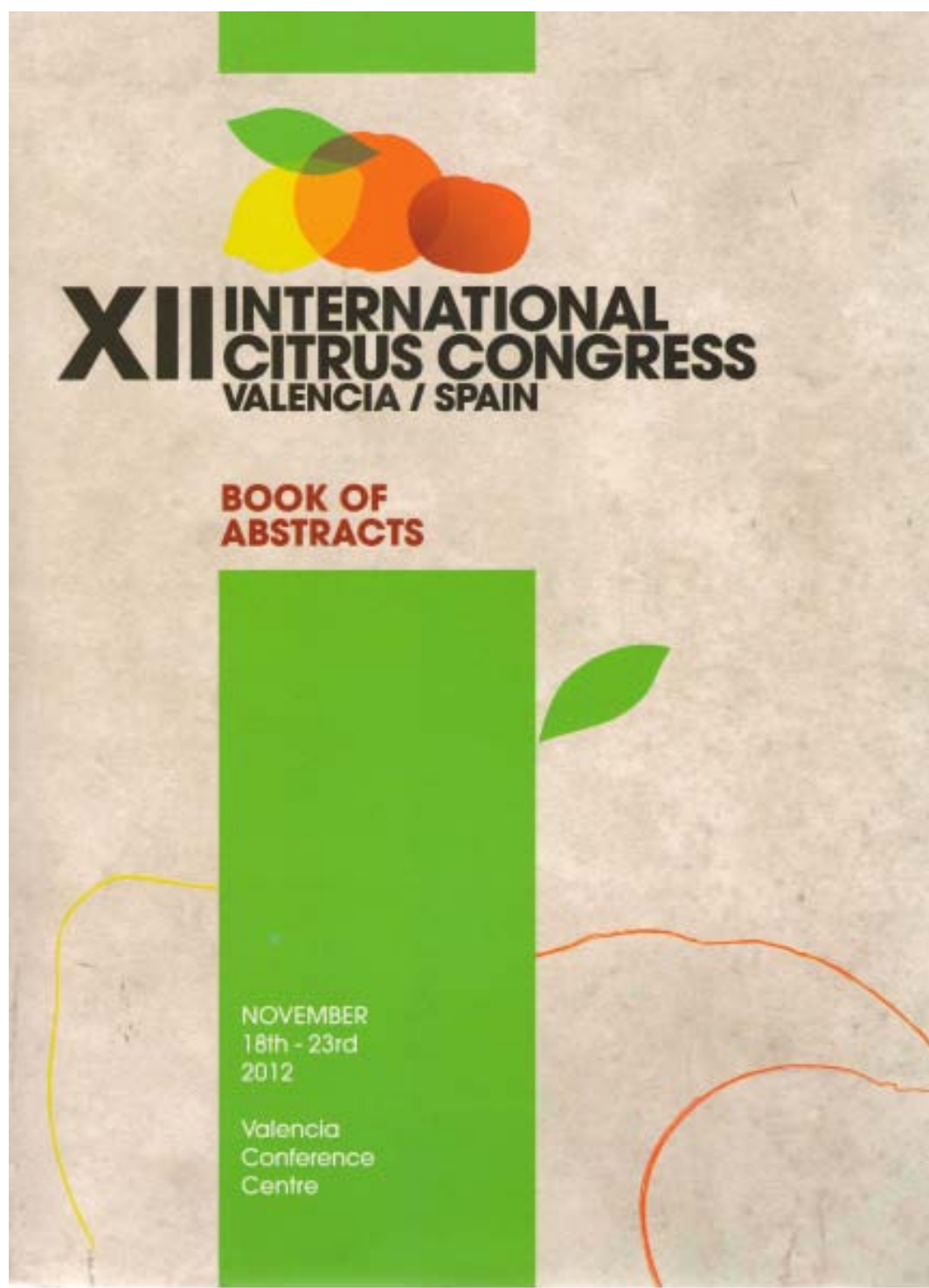
Abstract e poster in atti di convegno internazionale

1. Germana' MA, Micheli M, Chiancone B, Bianco C, Casales F G, Defez R (2012). Preliminary Results on Biotization of Encapsulated Vitro-Derived Propagules of Carrizo Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. In: Book of abstracts. p. 91, Valencia, Spain, November 18th-23rd
2. Chiancone B., Casales F.G., Mondello V., Torta L., Burruano S. e Germanà M.A. (2013) *Ex-Vitro* Mycorrhization of *Vitro*-Derived Plantlets of Carrizo Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. 8th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding (ISHS) (2-7 giugno, 2013, Coimbra, Portogallo).
3. Casales F., Chiancone B., Micheli M., Germanà M.A. (2013) Study on Conversion of Encapsulated *Vitro*-Derived Propagules of C35 Citrange [*C. sinensis* (L.) Osb. × *P. trifoliata* (L.) Raf.]. 8th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding (ISHS) (2-7 giugno, 2013, Coimbra, Portogallo).

Abstract e poster in atti di convegno nazionale

- 1) Chiancone B, Casales FG, Germana' MA (2011). Radicazione ed incapsulamento di talee vitro-derivate di citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] Carrizo. 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Un incontro tra gli operatori del Settore e della Ricerca. Sanremo (IM).
- 2) Casales FG, Chiancone B, Di Lauria C, Germana' MA (2011). Studio sull'incapsulamento di microtalee vitro-derivate di un genotipo siciliano di gelso (*Morus nigra* L.). 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Un incontro tra gli operatori del Settore e della Ricerca. Sanremo (IM). p. 257-260, ISBN: 978-88-905628-6-0, Sanremo, 7-9 novembre, 2011.

Abstract e poster in atti di convegno internazionale



therefore the addition of complementary dominant traits. In this work, protoplasts were isolated from callus of *Citrus macrophylla* and from leaves of 'Carrizo' citrange (*C. sinensis* × *P. trifoliata*). Chemical, electro-chemical and electric fusions were performed and the ploidy of regenerated plants was evaluated by flow-cytometry. Five tetraploid plants, one pentaploid plant, one mixoploid (3x-6x) plant and one heptaploid plant were recovered. All these plants were analyzed with SSR and SNP markers, distributed in the nine chromosomes of citrus. Cytoplasmic genomes were characterized with chloroplastic and mitochondrial markers. Mitochondrial genome was inherited from *C. macrophylla* for all plants while segregation was observed for the chloroplastic genome. Nuclear genome analysis revealed the loss of parental alleles in most of the regenerated plants. In tetraploids, it affected mainly *C. macrophylla* alleles while *P. trifoliata* alleles were mostly lost in 5x and 7x plants. The results indicate chromosome instability in this complex intergeneric combination with apparent non random loss of some chromosome fragments. Two allotetraploid somatic hybrids have been selected for evaluation as potential rootstocks.

S05P30

Preliminary results on biotization of encapsulated *in vitro*-derived propagules of 'Carrizo' citrange (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*)

Germanà M.A.¹, Micheli M.², Chiancone B.¹, Bianco C.³, Casales F.¹, and Defez R.³

¹Università degli Studi di Palermo, Dipartimento DEMETRA, Italy; ²Università degli Studi di Perugia, Italy (DSAA), Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Italy; and ³Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Genetica e Biofisica, Italy. mariaantonietta.germana@unipa.it

The encapsulation technology represents a new tool to integrate micropropagation into the nursery activity. It allows combine the advantages of zygotic or gametic seeds with those of micropropagation. The synthetic seed or artificial seed, described as "artificially encapsulated somatic embryos, shoots or other tissues which can be used for sowing under *in vitro* or *ex vitro* conditions", will be a powerful propagation tool in the nurseryman hands, if the levels of the synthetic seeds conversion will be increased also in the nurseries, without the asepsis of *in vitro* laboratories and with the presence of many parasitic microorganisms, like bacteria and fungi, responsible for contamination and/or for trophic competition. This research has been carried out in order to introduce the biotization to the synthetic seed technology of 'Carrizo' citrange (*C. sinensis* × *P. trifoliata*), one of the most widespread citrus rootstocks, because of its resistance to the *Citrus tristeza virus* (CTV). With this goal, preliminary experiments to set up protocols for biotization, through the introduction of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) into calcium alginate capsules of 'Carrizo' citrange *in vitro*-derived encapsulated microcuttings, have been carried out, in order to protect the plantlets from abiotic and biotic factors and to promote their growth during the first stages of development. Specifically, the *Sinorhizobium meliloti* wild type strain 1021 and its derivative RD64, that synthesizes 39-fold more IAA as compared to the wild type strain, have been used to evaluate their performances in inducing rooting of synthetic seeds.

S05P31

Biodegradable films made from PLA-limonene blends for food active packaging applications

Arrieta M.P.¹, López J.¹, Ferrándiz S.¹, and Peltzer M.²

¹Polytechnic University of Valencia (UPV), Technological Institute of Materials, Spain; and ²University of Alicante (UA), Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences Department, Spain. marrieta@itm.upv.es

Active packaging films are increasingly being investigated for their application in food packaging industry. Among these, an increasing proactive attitude towards a reduction on the environmental impact produced by food packaging materials has focused research on bio-based polymers. In this sense, polylactic acid (PLA) films have increasingly received attention due to its biodegradation, biocompatibility, overall good mechanical property, superior transparency, being obtained from renewable resources, and labeled as Generally Recognized as Safe material by the FDA. Packaging has a prominent role in packaged food products, being a key component in the food preservation. Since active agents could have an important effect on shelf-life extension of foods, a way to develop actives packaging is by adding antioxidants components into the packaging system. Essential oil rich in monoterpenes contain natural antioxidants and are recognized as food preservatives. Additionally, natural antioxidants are of great interest as stabilizers for polymers and the fact that natural antioxidants are



8th IVCHB 2013
International Symposium
on **In Vitro Culture**
and **Horticultural Breeding**

June 2-7 | University of Coimbra | Portugal

Book of Abstracts



• U



C •

ISHS



Study on conversion of encapsulated vitro-derived propagules of C35 citrange [*C. sinensis* (L.) Osb. × *P. trifoliata* (L.) Raf.]

Casales, F.¹; Chiancone, B.¹; Micheli, M.² and Germanà, M.A.¹

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Viale Delle Scienze, 11, 90128 Palermo, Italy. mariaantonia.germana@unipa.it

²Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Italy.

Fight against *Citrus Tristeza Virus* (CTV) implies the use of CTV-resistant rootstocks, such as the citranges. Synthetic seed or artificial seed (synseed), previously defined as "an encapsulated single somatic embryo" (Murashige, 1978), and now reported as "an artificially encapsulated somatic embryos, shoots or other tissues which can be used for sowing under *in vitro* or *ex vitro* conditions" (Aitken-Christie et al., 1995), combines advantages of micropropagation with handling ease, storability, reduced size, mechanization potentiality and transportability of the gametic seeds (Standardi and Piccioni, 1998; Micheli et al., 2003). The establishment of an efficient protocol with an enough high conversion of synthetic seed into plantlets under *in vitro* or *ex vitro* conditions could transform this technology in a powerful propagation tool in the nursery activity. Preliminary experiments on calcium-alginate encapsulation of microcuttings (unipolar propagules) were performed to evaluate the use of the *in vitro* culture techniques for the propagation and the preservation of different citrange rootstocks, such as Carrizo and Troyer. In this study, observations have been carried out on synthetic seeds produced encapsulating microcuttings obtained from the *in vitro* proliferation of C35 citrange, another important citrus rootstock. Particularly, uninodal segments (3-4 mm long) with two axillary buds, were encapsulated according the protocol reported by Germanà et al. (2011). Microcuttings were pretreated at 4°C, in the dark, for 3 days, then capsules were subjected to a rooting inductive treatment for 3 days at 4°C in the dark, before the sowing on a substrate without growth regulators (R5HF). Five theses were tested: 10 mg/l of IBA (T1), 10 mg/l of IAA (T2), 10 mg/l of IAA (T3), 5 mg/l IBA (T4) and the control, without treatment (C). After 45 days, the viability (% of explants green aspect, without necrosis or yellowing), the regrowth (% of encapsulated microcuttings producing shoots longer than 4 mm) and the conversion (emergence of shoots and roots long 4 mm from encapsulated microcuttings) of the encapsulated microcuttings were registered. Remarkable results have been obtained with the viability and the regrowth. The highest percentages of conversion were observed in the theses T3 and C. The level of conversion in C35 encapsulated microcuttings was higher than the one previously obtained in other citranges, such as Carrizo and Troyer.

Key words: C35 citrange, *Citrus Tristeza Virus*, micropropagation, synthetic seed

Ex-vitro mycorrhization of vitro-derived plantlets of Carrizo citrange [*C. sinensis* (L.) Osb. × *P. trifoliata* (L.) Raf.]

Chiancone, B.; Casales, F.G.; Burruano, S.; Mondello, V.; Torta, L. and Germanà, M.A.

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Italy.
mariaantonietta.germana@unipa.it

Nowadays, micropropagation techniques are widely used as an advantageous tool for rapid propagation of numerous plants. Although this technology has several successful applications, low survival rates and poor growth during the acclimatization to greenhouse conditions are critical problems hindering the use of this practice. Inoculating micropropagated plants with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), in coincidence with their passage from *in vitro* to *in vivo* conditions, could play a positive role on their performance during the acclimatization stage.

The objective of this study was to evaluate the influence of the inoculation (10 propagules/500 g substrate, following the manufacturer's instructions) by a commercial formulate containing *Glomus intraradices* propagules (M) on the response of *vitro*-derived Carrizo citrange plantlets, cultivated in two types of soil (sterile and non-sterile). Particularly, four theses were compared: 1) + M and cultivation in sterile soil; 2) + M and cultivation in non-sterile soil; 3) - M and cultivation in sterile soil; 4) - M and cultivation in non-sterile soil. The occurrence and the evolution of the mycorrhizal infection was monthly detected by a cleaning and staining (acid fuchsin) technique on rootlets, sampled from all the tested types of plantlets.

After three months in culture, the plantlets response regarding both the vegetative parameters and the level of infection, varied greatly, in dependence of both factors presence of the inoculum and sterilization of soil. In particular, the highest formation of new branched roots has been observed in plantlets cultivated in sterile soil + M. Good results were observed also in plantlets cultivated in non sterile soil - M. The same trend was observed analyzing the mycorrhizal infection. In fact the highest level of inoculation was observed in both + M sterile and - M non sterile theses, even if the colonization remained low. Results confirm, that also *in vitro*-derived plantlets, the low mycorrhizal-dependence of citrange, although the symbiosis induces a better growth of the rooting apparatus.

This preliminary research encourages additional studies about the influence of AMF on the response of micropropagated plants after the passage from *vitro* to *ex vitro* conditions. Especially, to increase the mycorrhizal infection and efficiency, it could be interesting to test a higher *inoculum* density, diverse AM fungal isolates, also on different citrange genotypes.

Key words: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Carrizo citrange, *Citrus* rootstocks, micropropagation, mycorrhization

11. Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro con i quali ho collaborato durante i tre anni di dottorato:

- la Prof.ssa M. A. Germanà, del Dipartimento S.A.F. della Facoltà di Agraria di Palermo, per la lettura critica della tesi e, soprattutto, per avermi indirizzato e supportato, rappresentando una figura fondamentale, dal punto di vista professionale e umano;
- la Dott.ssa B. Chiancone che mi ha introdotto al mondo della ricerca trasmettendomi le sue conoscenze e fornendomi sempre tantissimi consigli preziosi;
- il Dott. M. Micheli del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia, per la collaborazione offerta nella realizzazione delle prove sul seme sintetico di citange Carrizo e C35;
- il Dott. L. Torta del Dipartimento S.A.F. della Facoltà di Agraria di Palermo, che mi ha aiutato attraverso i suoi preziosi consigli alla corretta riuscita della prova di micorrizzazione *ex-vitro* di piantine *vitro*-derivate di citrange Carrizo;
- il Dott. Ahmed Mohamed Abdelgalel Mohamed che ha condiviso con me questi anni di dottorato, dimostrandosi una valida persona dal punto di vista professionale oltre che un amico;
- il CRA-ACM per avere fornito i frutti di citrange Carrizo e C35.

Alcune ricerche svolte nell'ambito della mia tesi sono state supportate dal progetto: "Lotta al virus della Tristezza degli Agrumi: Sviluppo e Innovazione", finanziato dall'Assessorato Regionale delle Risorse Agricole e Alimentari, Dipartimento Regionale degli Interventi Infrastrutturali per l'Agricoltura della Regione Sicilia.